

Université de Montréal

Étude de chimères dérivées d'un rétrovirus murin et du virus de l'immunodéficience humaine

par

Karine Gendron

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Biochimie

Novembre, 2004

© Karine Gendron, 2004



W

4

U58

2005

v.056

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de chimères dérivées d'un rétrovirus murin et du
virus de l'immunodéficience humaine**

présenté par :
Karine Gendron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Boileau, président-rapporteur
Léa Brakier-Gingras, directeur de recherche
Guy Lemay, co-directeur
Nikolaus Hevecker, membre du jury

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) utilise un changement programmé du cadre de lecture (*frameshift* -1) pour exprimer le précurseur des enzymes virales, Gag-Pol. Ce *frameshift* se produit au niveau d'une séquence dite glissante suivie d'une structure particulière, le signal stimulateur. Le but de mon projet était de développer un modèle animal pratique et peu coûteux pour étudier *in vivo* l'effet d'agents ciblant le *frameshift* du VIH-1. Notre stratégie a été de créer une chimère dérivée du virus de la leucémie murine (MuLV), un rétrovirus murin utilisant la suppression programmée d'un codon de terminaison (*readthrough*) pour exprimer Gag-Pol, en insérant la région de *frameshift* -1 du VIH-1 dans le génome de MuLV de façon à ce que la production de Gag-Pol dépende d'un *frameshift*. Le signal stimulateur était soit une longue tige-boucle irrégulière correspondant au signal complet, soit une tige-boucle plus courte, considérée auparavant comme le signal stimulateur, soit le signal complet contenant une délétion de trois nucléotides. Nos résultats montrent que les trois virus chimériques peuvent se répliquer et se propager dans des cellules en culture, mais des essais d'infectivité montrent que les chimères sont de trois à cinq fois moins infectieuses que le virus sauvage. Nous avons aussi comparé l'efficacité du *readthrough* à celle du *frameshift* des constructions utilisées. Dans tous les cas, l'efficacité de *frameshift* est inférieure (24% à 55%) à l'efficacité de *readthrough*. Ceci se reflète par une diminution de la production de Gag-Pol dans les chimères qui serait responsable de la diminution d'infectivité. Quoique les chimères soient moins infectieuses que le virus sauvage, elles se révèlent des outils potentiellement intéressants pour étudier *in vivo* l'effet d'agents ciblant le *frameshift* du VIH-1.

Mots-clés : VIH, virus chimérique, MuLV, *frameshift*, *readthrough*

Abstract

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) requires a programmed -1 frameshift event to synthesize the precursor of its enzymes, Gag-Pol. This frameshift occurs at a slippery sequence followed by a secondary structure called the stimulatory signal. The aim of my project was to develop a convenient animal model to study *in vivo* the effects of agents targeting the frameshift of HIV-1. Our strategy was to create a chimeric derivative of the murine leukemia virus (MuLV), a murine retrovirus that uses the readthrough of a stop codon to synthesize Gag-Pol. We inserted the HIV-1 frameshift region into MuLV genome in such a way that the synthesis of Gag-Pol depends upon a -1 frameshift. The stimulatory signal was either a long bulged helix, corresponding to the complete HIV-1 signal, or a simple stem-loop, previously considered as the stimulatory signal, or a complete signal with a three-nucleotide deletion. The chimeric proviruses replicated and propagated in cultured cells, but infectivity assays revealed a decrease of about three to five-fold in the infectivity of the chimeric virions. In parallel, we compared the readthrough efficiency of MuLV to the frameshift efficiencies of the constructions used in this study. In all the cases, the frameshift efficiency was lower (24% to 55%) than the readthrough efficiency. This is reflected in a decrease of Gag-Pol in the chimeras, which likely accounts for the decreased infectivity of the chimeric viruses. Even if the chimeras are less infectious than the wild-type virus, they are potentially interesting tools to assess *in vivo* the effect of anti-frameshift agents.

Keywords : HIV, chimeric virus, MuLV, frameshift, readthrough

*À ma mère, mon père et mon frère
parce qu'ils sont toujours là pour moi*

Remerciements

Il y a beaucoup de monde que je tiens à remercier pour l'accomplissement de ce mémoire. D'abord, merci à ma directrice de recherche, Dr Léa Brakier-Gingras, pour sa patience, son expertise et sa grande compréhension. Merci de prendre le temps de bien former les étudiants. Un merci particulier pour tout le temps qu'elle a passé avec moi à corriger les nombreux textes que ma maîtrise m'a amené à écrire. Ses talents de pédagogues et ses encouragements vont m'être très utiles dans ma future carrière de communicatrice scientifique.

Merci ensuite à tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyé, Dominic, Francis, François, Marie-Noëlle, Martin, Mélissa et Sacha ainsi que les nombreux stagiaires. Merci spécialement à Martin, pour avoir superviser mon stage, à Dominic, pour son aide technique (et philosophique !), à Mélissa pour son aide technique et son soutien moral et à François pour son aide « ribosomique ». Merci à tous pour les nombreuses conversations scientifiques. Je ne vous oublierai pas.

Un merci particulier à ma famille que j'adore et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui (dans tous les sens du terme). Merci à mes parents de m'avoir encouragé à poursuivre mes études et d'avoir tout fait en leur possible pour me permettre de les terminer, autant monétairement que psychologiquement. Merci à mon frère pour sa présence et ses conversations. Merci à mes amis pour leur patience, leur soutien et leur côté divertissant. Je sais que vous allez tous m'encourager et me supporter dans mon changement de carrière. Merci.

Merci au Dr Gerardo Ferbeyre, au Dr Luc DesGroseillers et au Dr Nikolaus Hevecker pour avoir lu et critiqué mon article. Merci à mon co-directeur, Guy Lernay, et à Éric Rassart. Merci enfin à tous les professeurs que j'ai eu depuis la maternelle qui m'ont

donné le goût d'apprendre et le goût de la science. Merci à la danse, ma passion, qui me permet de garder un esprit sain dans un corps sain. Merci à mon auto de m'avoir transporté jusqu'à l'université pendant quatre ans et de tenir encore le coup! Merci aussi à tous les gens qui m'inspirent (il en faut !). Finalement, merci à tous ceux qui vont lire ce mémoire. J'espère que vous l'apprécierez puisqu'il s'agit d'un (bref) résumé de deux ans et demi de travail.

Table des matières

Liste des tableaux.....	v
Liste des figures	v
Liste des abréviations.....	viii
Chapitre I: Introduction.....	2
1.1 La problématique	3
1.2 Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et le virus de la leucémie murine (MuLV)	5
1.2.1 Le génome du VIH-1	5
1.2.2 Résumé du cycle de réplication du VIH-1	8
1.2.2.1 Les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1	10
1.2.2.2 Les étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1	12
1.2.3 Le génome de MuLV et son cycle de réplication	13
1.3 Cibles potentielles pour le développement de thérapies contre le VIH.....	16
1.3.1 Ciblage de l'entrée des virus.....	17
1.3.2 Ciblage de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire.....	18
1.3.3 Ciblage du frameshift programmé -1	19
1.4 Les mécanismes de traduction non-conventionnelle chez les eucaryotes	20
1.4.1 La traduction conventionnelle et le <i>recoding</i>	20
1.4.2 Rôle du <i>recoding</i> chez les rétrovirus	24
1.4.3 Le changement de cadre de lecture programmé (<i>frameshift</i> ribosomique).....	27
1.4.3.1 Le <i>frameshift</i> programmé -1 chez les eucaryotes.....	28
1.4.3.2 Le <i>frameshift</i> programmé chez les rétrovirus : cas du VIH-1.....	30
1.4.4 La suppression d'un codon de terminaison (<i>readthrough</i>).....	37
1.4.4.1 Le <i>readthrough</i> programmé chez les eucaryotes	40
1.4.4.2 Le <i>readthrough</i> programmé chez les rétrovirus : cas du MuLV	43
1.5 Développement de modèles animaux pour l'étude d'agents anti-VIH.....	47

1.5.1	Le macaque	47
1.5.2	Le rat	48
1.5.3	La souris.....	49
1.6	But de mon projet.....	52
Chapitre II: The virion-associated Gag-Pol is decreased in chimeric Moloney murine leukemia viruses in which the readthrough region is replaced by the frameshift region of the human immunodeficiency virus type 1.....		54
Chapitre III : Discussion		84
5.1	Rappel de la problématique	85
5.2	Étude de l'infectivité des MuLV chimériques	88
5.3	Étude de la relation entre la synthèse de Gag-Pol de chacune des chimères et la diminution d'infectivité observée	91
5.4	Évaluation des efficacités du <i>frameshift</i> du VIH-1 et du <i>readthrough</i> de MuLV	93
5.5	Relation entre la diminution d'infectivité et la diminution du rapport Gag-Pol/Gag.....	96
5.6	Conclusions et perspectives	97
Bibliographie.....		101

Liste des tableaux

Figure 5-1 : Efficacités absolues et relatives de <i>frameshift</i> du VIH-1 et de <i>readthrough</i> du MuLV.....	94
--	----

Liste des figures

Figure 1-1 : Génome du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).....	7
Figure 1-2 : Cycle de réplication du VIH-1.....	9
Figure 1-3 : Entrée du VIH dans la cellule-cible.....	11
Figure 1-4 : Schéma de l'organisation du virion immature et du virion mature.....	14
Figure 1-5 : Génome du virus de la leucémie murine (MuLV).....	15
Figure 1-6 : Schéma des étapes de l'élongation de la traduction conventionnelle eucaryote.....	22
Figure 1-7 : Importance du rapport Gag-Pol/Gag pour l'infectivité des virions.....	26
Figure 1-8 : Modèle du glissement simultané des ARNt proposé par Jacks et Varmus.....	31
Figure 1-9 : La région de <i>frameshift</i> du sous-type B du groupe M du VIH-1.....	32
Figure 1-10 : Modèle de l'interaction entre le signal stimulateur de <i>frameshift</i> du VIH-1 et le ribosome proposé par Léger <i>et al.</i>	36
Figure 1-11 : Description du mouvement de l'ARNm lors d'un frameshift -1.	38
Figure 1-12 : La région de <i>readthrough</i> de MuLV.....	42

Figure 1-13 : Comparaison des appariements entre l'anticodon d'ARNt et le codon correspondant ou un codon de terminaison	44
Figure 2-1 : Structure of the HIV-1 frameshift region inserted in the genome of Moloney Murine Leukemia Virus (MoMuLV) at the <i>gag-pol</i> junction.....	78
Figure 2-2 : Details on the sequence of the <i>gag-pol</i> junction in the proviral DNA of wild-type and chimeric MoMuLV.....	79
Figure 2-3 : Analysis of the infectivity of the chimeric viruses by replication and single-round infection assays.....	80
Figure 2-4 : Analysis of the processing of the Gag polypeptide by Western Blot and assessment of the Gag-Pol/Gag ratio in the chimeric virions.....	81
Figure 2-5 : Comparison of the frameshift efficiency of HIV-1 to the readthrough efficiency of MoMuLV.....	82

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ARNt ^{Lys}	ARN de transfert portant la lysine
ARNt ^{Met}	ARN de transfert portant la méthionine
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytosine
CA	Protéine de la capside
CCR5	<i>chemokine receptor 5</i>
Cdk9	<i>Cyclin dependent kinase 9</i>
CXCR4	<i>chemokine receptor 4</i>
eEF1	<i>eukaryotic elongation factor 1</i>
eEF2	<i>eukaryotic elongation factor 2</i>
eRF1	<i>eukaryotic release factor 1</i>
eRF3	<i>eukaryotic release factor 3</i>
<i>frameshift</i>	changement de cadre de lecture

G	Guanine
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanidine triphosphate
HP68	<i>host protein 68</i>
hu	humanisée
IN	Intégrase
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Protéine de la matrice
mCAT1	<i>murine cationic amino acid transporter 1</i>
MMTV	<i>mouse mammary tumour virus</i>
MoMuLV	Virus de la leucémie murine Moloney
MuLV	Virus de la leucémie murine
NC	Protéine de la nucléocapside
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i> (lymphocytes du sang circulant)
PRO	Protéase
<i>Readthrough</i>	Suppression d'un codon de terminaison
RNase V1	Ribonucléase V1
RRE	<i>rev response element</i>
RT	Transcriptase inverse
S	Svedberg

SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SIDA	syndrome de l'immunodéficience humaine
SU	Protéine de surface
TM	Protéine transmembranaire
TSG101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
U	Uracile
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne

Chapitre I

Introduction

1.1 La problématique

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable du syndrome de l'immunodéficience humaine acquise (SIDA), une des maladies infectieuses les plus graves du 21^e siècle. Depuis son apparition il y a environ vingt ans, le VIH a tué plus de 20 millions de personnes dont trois millions en 2003. Aujourd'hui, plus de 40 millions de personnes en sont infectées, dont plus de la moitié en Afrique subsaharienne (UNAIDS 2004). L'ampleur de la pandémie explique que les recherches visant à développer des traitements et des vaccins contre ce virus se multiplient. La tri-thérapie présentement utilisée contre le VIH est basée sur l'emploi d'inhibiteurs de deux enzymes virales, la protéase et la transcriptase inverse (Mathe 1997). Cette thérapie permet de réduire considérablement la charge virale et de ralentir le développement de la maladie. Cependant, elle ne permet pas la guérison des patients infectés et elle comporte plusieurs inconvénients majeurs. Son coût est très élevé (Bartlett et al. 2001). Son utilisation entraîne d'importants effets secondaires et est contraignante puisque les patients doivent prendre plusieurs médicaments par jour et suivre un régime alimentaire compliqué (Max and Sherer 2000). De plus, la majorité des personnes infectées n'ont pas accès à ces agents puisqu'ils vivent dans des pays pauvres où la tri-thérapie n'est pas disponible (Hahn et al. 2000). Toutefois, le plus gros problème rencontré avec cette thérapie est la résistance développée par le virus aux médicaments utilisés (Mathe 1997). En effet, étant donné que la transcriptase inverse, responsable de la transcription du génome viral d'ARN en ADN, ne possède pas d'activité de correction des erreurs (*proofreading*), le VIH a la capacité de muter facilement, ce qui lui permet de devenir rapidement résistant aux agents antiviraux. Pour toutes ces raisons, il est impératif de chercher des nouvelles cibles pour développer des thérapies contre le VIH qui seraient moins coûteuses, moins toxiques, plus accessibles et qui seraient efficaces contre des virus résistants aux inhibiteurs présentement utilisés.

Le développement de ces nouveaux agents nécessite d'étudier leurs effets dans un animal avant de passer aux essais cliniques. Actuellement, il n'existe aucun modèle animal pratique et peu coûteux pour tester des agents anti-VIH, puisque les petits animaux habituellement utilisés en laboratoire pour tester de nouveaux médicaments ne sont pas susceptibles à l'infection par le VIH. Depuis plusieurs années, de nombreux chercheurs tentent de développer un modèle animal pratique, susceptible au VIH. Notre équipe s'intéresse au développement d'un modèle murin qui serait non pas susceptible au VIH, mais utilisable pour l'étude d'agents ciblant le *frameshift* du VIH-1. Le changement du cadre de lecture programmé d'une base en direction 5' (*frameshift* traductionnel programmé -1) est un mécanisme de traduction non-conventionnelle utilisé par ce virus et essentiel pour son infectivité. Notre stratégie consiste à créer une chimère dérivée du virus de la leucémie murine (MuLV), un rétrovirus infectant les souris. Comme pour le VIH, la réplication et la propagation du MuLV nécessitent un mécanisme de traduction non-conventionnelle. Cependant, il utilise une suppression programmée d'un codon de terminaison (*readthrough* programmé) plutôt qu'un *frameshift* -1. La chimère que nous voulons construire contiendrait une portion du génome du VIH qui serait insérée dans le génome de MuLV de façon telle que la prolifération de la chimère du rétrovirus murin ne dépendrait plus d'un *readthrough*, mais d'un *frameshift* traductionnel comme pour le VIH. Les sections qui suivent décrivent quelques caractéristiques du VIH-1 et du MuLV ainsi que quelques cibles potentielles pour le développement de nouveaux agents anti-VIH. Vient ensuite une brève revue de la traduction conventionnelle chez les organismes eucaryotes ainsi qu'une description des deux mécanismes de traduction non-conventionnelle utilisés respectivement par le VIH et par MuLV à savoir le *frameshift* traductionnel programmé et le *readthrough* programmé. L'importance de ces mécanismes pour ces rétrovirus est ensuite analysée et, finalement, quelques modèles animaux en voie de développement pour l'étude d'agents anti-VIH sont décrits.

1.2 Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et le virus de la leucémie murine (MuLV)

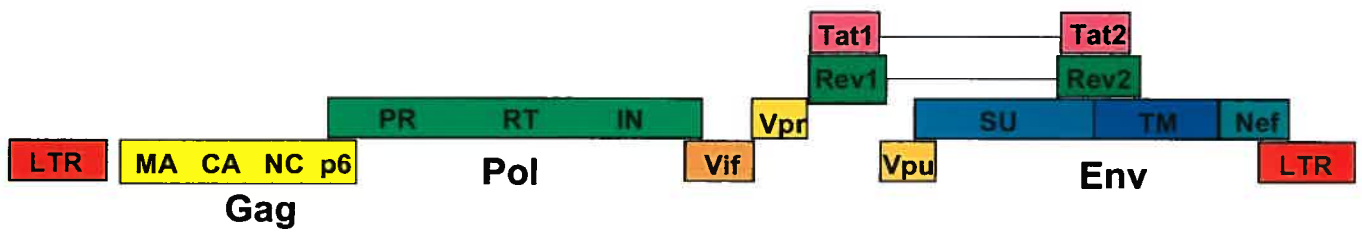
1.2.1 Le génome du VIH-1

Le VIH est un rétrovirus humain complexe faisant partie de la famille des lentivirus qui infecte majoritairement les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes (Greene 1991). Il existe deux types de VIH, le type 1 et le type 2, qui se distinguent par l'organisation de leur génome et leur relation phylogénétique avec les autres lentivirus infectant les primates (Hahn et al. 2000). Le VIH de type 1 (VIH-1) est responsable de la pandémie alors que le VIH de type 2 (VIH-2) est beaucoup moins virulent. Ce travail se concentre donc seulement sur l'étude du VIH-1. Le VIH-1 est subdivisé en trois groupes (M pour *Main*, N pour *New* et O pour *Outlier*), une classification basée sur les variations dans les séquences génomiques des virus (Los Alamos National Laboratory 2002). Le groupe M, responsable de plus de 99% des infections mondiales, est lui-même subdivisé en neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) d'après des analyses phylogénétiques (Velazquez-Campoy et al. 2001). Le groupe O comprend les virus ayant des séquences génomiques qui se ressemblent entre elles mais qui diffèrent beaucoup de celles des virus du groupe M. Le groupe N, quant à lui, est encore mal défini et englobe les virus qui ne font partie, ni du groupe M, ni du groupe O. Il est à noter que la plupart des recherches concernant le VIH-1 sont faites sur le sous-type B du groupe M, le groupe prépondérant en Europe et en Amérique du Nord, malgré le fait que les sous-types A et C soient les deux sous-types les plus répandus mondialement (Los Alamos National Laboratory 2002).

La famille des lentivirus dont fait partie le VIH-1 comprend des rétrovirus dont le génome est très complexe et très organisé. Cette complexité a permis au VIH-1 de développer des mécanismes originaux qui permettent d'expliquer sa virulence et sa

persistance. Comme chez tous les rétrovirus, son matériel génétique est contenu dans une molécule d'ARN simple brin, présente en deux copies dans les virions. Son génome (9kb) comporte neuf cadres de lecture codant pour quinze protéines (pour des revues, voir Frankel and Young 1998; Tang et al. 1999; Bour and Strebel 2003; Greenway et al. 2003; Kao et al. 2003; Zander et al. 2003) (voir figure 1-1). Les *long terminal repeat* (LTR) flanquant le génome proviral contiennent des séquences qui régulent l'expression des gènes viraux au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Chez tous les rétrovirus, les gènes *gag*, *pol* et *env* codent respectivement pour les protéines de structure des virions, pour les enzymes virales et pour les protéines contenues dans l'enveloppe virale. Ces trois gènes sont traduits sous forme de précurseurs polyprotéiques qui sont ensuite clivés, soit par une protéase cellulaire (Env), soit par la protéase virale lors de la maturation des virions (Gag et Pol). Le clivage du précurseur Gag génère la protéine p6 qui joue un rôle dans la relâche des particules virales et les protéines de structure, soit la matrice (MA), la capside (CA) et la nucléocapside (NC) qui forment le *core* du virion. Les protéines du *core* servent entre autres à protéger le génome viral d'ARN de l'attaque par des enzymes cellulaires. Le précurseur Pol code pour les enzymes virales essentielles soit la protéase (PRO) qui clive les précurseurs polyprotéiques, la transcriptase inverse (RT) qui transcrit le génome viral d'ARN en ADN et l'intégrase qui catalyse l'intégration du génome viral d'ADN dans le génome des cellules infectées. Le précurseur Env est clivé en protéine de surface (SU) et en protéine transmembranaire (TM), deux protéines localisées dans l'enveloppe lipidique virale qui ont pour rôle de reconnaître les récepteurs et co-récepteurs cellulaires et de permettre la fusion des membranes. Les six autres gènes présents dans le génome du VIH-1 codent pour des protéines régulatrices et accessoires : Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu et Nef. Ces protéines possèdent des fonctions essentielles au déroulement du cycle de réplication du VIH-1. En effet, elles contrôlent différents aspects de la réplication virale dont l'infectivité des virions (Vif et Nef), l'expression du génome viral (Tat, Rev et Vpr) et l'assemblage des particules virales (Vpu).

Figure 1-1 : Génome du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Le génome du VIH de type 1 (9kb) est composé de neuf cadres de lecture (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *env* et *nef*) codant pour quinze protéines. L'ARN viral possède un LTR (*long terminal repeat*) qui contient des séquences régulatrices de l'expression des gènes viraux au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'ADN proviral est flanqué par deux LTRs, le LTR étant dupliqué lors de la transcription inverse de l'ARN viral. La ligne qui relie les deux portions (1 et 2) d'ARN codant pour les gènes Tat et Rev représente la portion d'ARN éliminée lors de l'épissage.

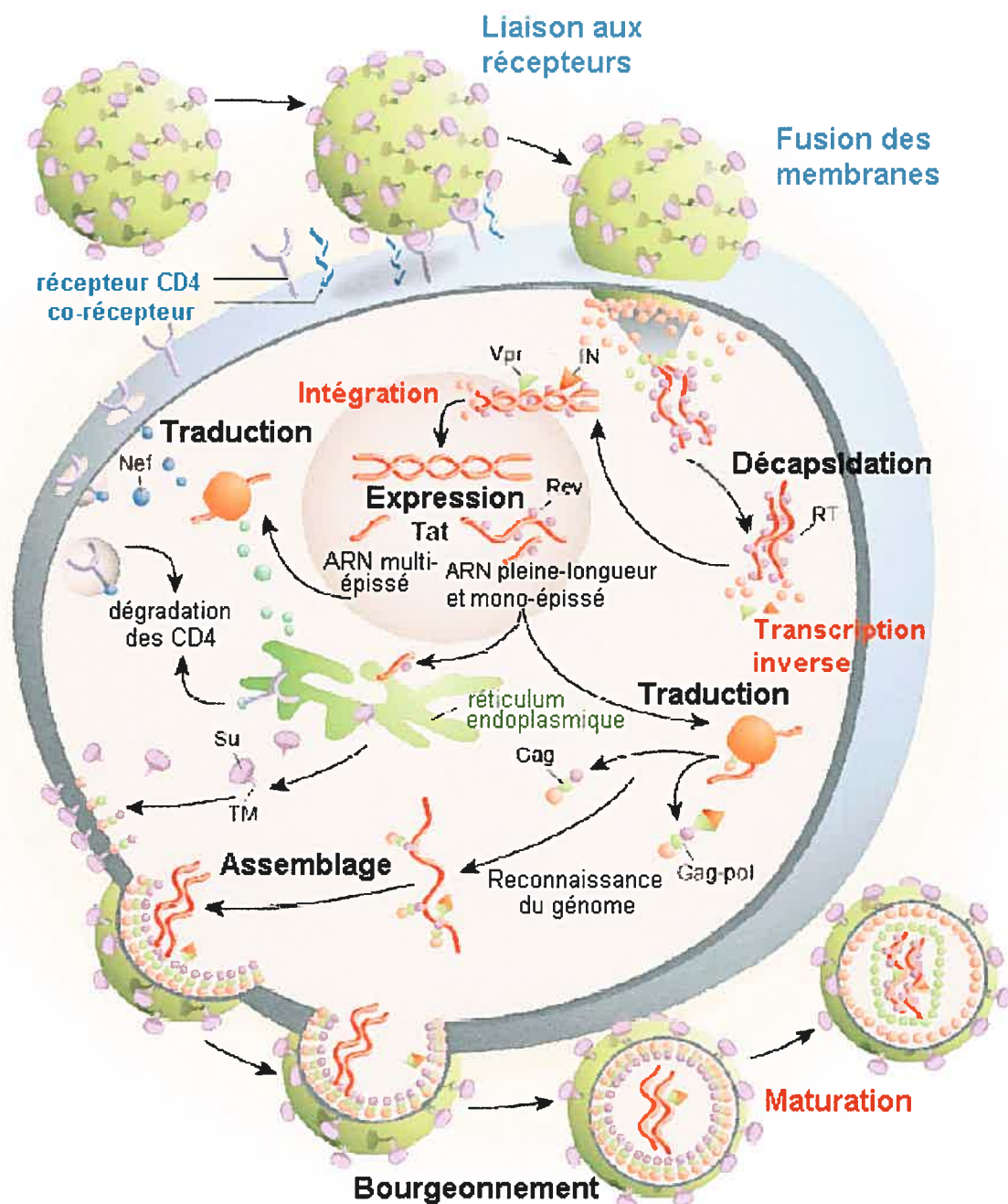


Les protéines accessoires sont traduites à partir d'ARN messagers (ARNm) multi-épissés, c'est-à-dire épissés en plusieurs sites, le précurseur Env est traduit à partir d'un ARNm mono-épissé et les précurseurs Gag et Pol sont traduits à partir de l'ARN messenger de pleine longueur. Les gènes *gag* et *pol* se trouvent sur le même ARN, mais dans deux cadres de lecture différents, et se chevauchent sur une courte région (Jacks et al. 1988). Le gène *gag* est exprimé par traduction conventionnelle alors que le gène *pol*, qui ne possède pas de codon initiateur au début de sa séquence codante, est exprimé grâce à un mécanisme de traduction non conventionnelle appelé changement du cadre de lecture programmé -1 ou *frameshift* -1, qui se produit durant la traduction de Gag. Les ribosomes débutent la traduction de l'ARNm de pleine longueur au codon initiateur de *gag*. La majorité des ribosomes terminent la traduction au codon de terminaison de *gag* et produisent le précurseur Gag. Cependant, une minorité de ribosomes (environ 5%) glissent d'un nucléotide en direction 5' au niveau d'une séquence d'ARN particulière située en amont du codon stop de *gag*. Ils se retrouvent ainsi dans le cadre de lecture de *pol* et continuent la traduction jusqu'à ce qu'ils atteignent le codon de terminaison de *pol*. Le précurseur ainsi obtenu est appelé Gag-Pol puisque, jusqu'à la région de *frameshift*, sa séquence est identique à celle du précurseur Gag. Cette stratégie originale de traduction d'un messenger permet au VIH-1 de contrôler le niveau d'expression de ses enzymes par rapport à ses protéines de structure.

1.2.2 Résumé du cycle de réplication du VIH-1

La complexité du génome du VIH-1 se reflète dans son cycle de réplication (figure 1-2) qui peut être séparé en deux parties soit les étapes précoces (avant la transcription du génome viral) et les étapes tardives. Plusieurs étapes requièrent la participation de facteurs cellulaires, mais comme il s'agit d'un résumé, seulement un nombre limité sera mentionné.

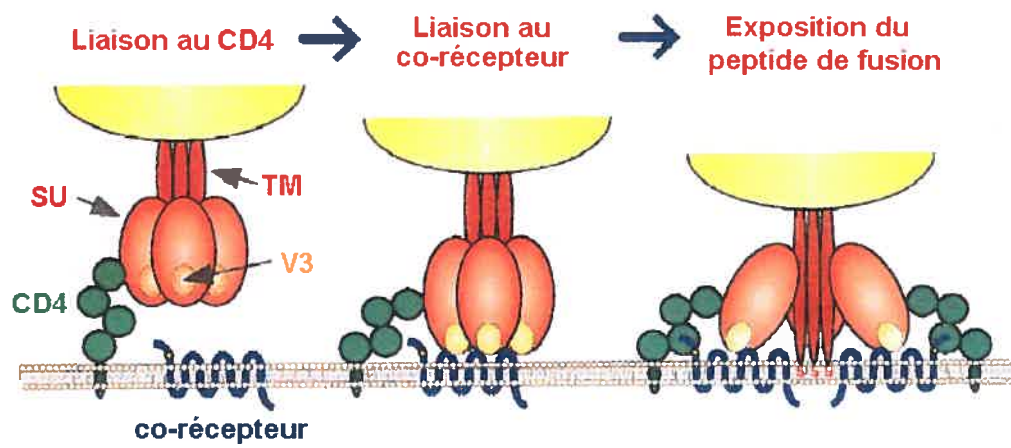
Figure 1-2: Cycle de réplication du VIH-1. Le virus mature et infectieux effectue un cycle de réplication dans une cellule-cible : entrée du virus par fusion des membranes, décapsidation de l'ARN génomique viral, transcription inverse de l'ARN simple brin viral en ADN double brin, importation de l'ADN viral dans le noyau, intégration du génome viral au génome cellulaire, transcription du provirus à un niveau basal et multi-épissage de l'ARN produit, traduction des protéines précoces (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu et Nef) transactivation de la transcription par Tat et empêchement de l'épissage par Rev, traduction des protéines tardives (précurseurs Gag, Gag-Pol et Env), assemblage des virions au niveau de la membrane, relâche des virions immatures par bourgeonnement et maturation des virions. Pour les détails, voir le texte (adapté de Oregon State University 2004).



1.2.2.1 Les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1

L'entrée du virus dans les cellules se fait par fusion de son enveloppe lipidique avec la membrane des cellules-cibles (figure 1-3). La protéine de surface (SU) du virus interagit d'abord avec le récepteur cellulaire CD4. Cette liaison entraîne un changement conformationnel de SU qui expose la boucle V3, responsable de la reconnaissance du co-récepteur, et permet la liaison du virus avec un co-récepteur cellulaire (CCR5, CXCR4, ...) (Kwong et al. 2000). La portion de la protéine transmembranaire (TM) permettant la fusion des membranes, appelée peptide de fusion, est alors exposée, ce qui entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Chan et al. 1997). Après l'internalisation du virus, le *core*, contenant les protéines structurales, les enzymes virales et le génome viral, est relâché dans le cytoplasme et est décapsidé. Le génome viral d'ARN simple brin est alors transcrit en ADN double brin par la transcriptase inverse virale, ce qui permet le dédoublement du LTR (Stevenson 2002). Cet ADN s'associe entre autres à l'intégrase virale, à la protéine de la matrice et à la protéine accessoire Vpr pour former le complexe de pré-intégration (PIC). Ce complexe permet le transport actif de l'ADN viral dans le noyau. L'intégrase catalyse ensuite l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. La forme intégrée du génome viral est appelée provirus. Le provirus est transcrit à un niveau basal par l'appareil transcriptionnel cellulaire. Les ARNm obtenus sont multi-épissés, exportés dans le cytoplasme et traduits par les ribosomes cellulaires. Cela permet la synthèse des protéines précoces soit les protéines régulatrices (Tat et Rev) et les protéines accessoires (Vif, Vpr, Vpu et Nef). La protéine accessoire Nef, par exemple, va entraîner la déplétion des récepteurs CD4, un des symptômes associé à l'infection par le VIH (Frankel and Young 1998; Tang et al. 1999; Stevenson 2002). Le moment où les protéines nouvellement traduites commencent à jouer leur rôle marque le début des étapes tardives.

Figure 1-3 : Entrée du VIH dans la cellule-cible. La protéine de surface (SU) est liée à la protéine transmembranaire TM, elle-même associée avec la membrane lipidique virale. SU se lie au récepteur cellulaire CD4 à la surface des cellules-cible. Cette liaison produit un changement conformationnel dans SU qui entraîne l'exposition de la boucle V3, la boucle responsable de la reconnaissance du co-récepteur cellulaire. Lorsque SU lie le co-récepteur, un second changement conformationnel se produit qui entraîne l'exposition de la portion de TM permettant la fusion des membranes, appelée peptide de fusion. Le peptide de fusion se lie à la membrane cellulaire, entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et permet l'entrée du virus dans la cellule-cible (adapté de Oregon State University 2004)



1.2.2.2 Les étapes tardives du cycle de réplication du VIH-1

Le provirus intégré possède une taille considérable (9kb). Une transcription efficace nécessite une transactivation par la protéine virale Tat associée avec une protéine kinase cellulaire, la *cycline-dependent kinase 9* (Cdk9), qui est elle-même associée avec la cycline T1. Ce complexe augmente fortement la processivité de la polymérase cellulaire en se liant au niveau du promoteur situé dans les LTRs (Frankel and Young 1998; Garber and Jones 1999; Tang et al. 1999). Cette transactivation augmente le niveau de transcription de l'ADN proviral. Comme mentionné précédemment, l'ARNm viral transcrit est multi-épissé. Cependant, le virus a besoin que l'ARN de pleine longueur et l'ARN mono-épissé soient exportés dans le cytoplasme pour que les gènes *gag*, *pol* et *env* soient traduits et pour que l'ARN de pleine longueur soit encapsidé lors de l'assemblage des particules virales. C'est la protéine Rev qui va permettre ces événements en se liant à l'ARNm viral transcrit, au niveau d'une séquence particulière appelée *rev response element* (RRE), localisée dans la portion centrale de la séquence codante pour *env*. Cette liaison empêche l'épissage multiple de l'ARN viral transcrit, permettant ainsi l'exportation nucléaire de l'ARN viral de pleine longueur et de l'ARN mono-épissé codant pour Env (Tang et al. 1999). Les précurseurs Gag, Gag-Pol et Env sont alors traduits par les ribosomes cytoplasmiques et Env est clivé par une protéase cellulaire, possiblement la furine (Binley et al. 2002), dans le réticulum endoplasmique, générant la protéine de surface (SU) et la protéine transmembranaire (TM). Dès que le précurseur Gag est produit, l'assemblage des particules virales se fait rapidement, car les protéines de structure sont toxiques pour la cellule. L'assemblage se produit au niveau de la membrane cellulaire. Les détails de ce mécanisme ne sont pas encore complètement compris, mais on sait que la participation de plusieurs facteurs viraux et cellulaires est requise dont TSG101, une protéine endosomale qui influence la morphogenèse des virions et leur bourgeonnement (Garrus et al. 2001), et HP68, une protéine liant l'ATP qui joue un rôle dans l'assemblage des virions et la formation de leur capsid (Zimmerman et al. 2002). Les virions immatures contiennent les précurseurs Gag et

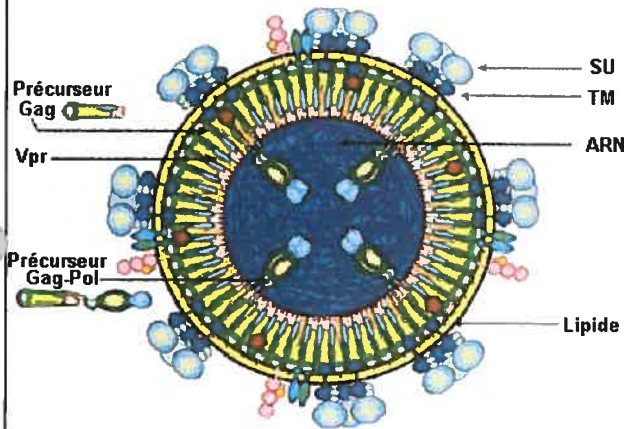
Gag-Pol, deux copies de l'ARN génomique viral simple brin qui interagissent pour former un dimère, les trois protéines accessoires Vpr, Vif et Nef, les protéines de l'enveloppe SU et TM ainsi que plusieurs facteurs cellulaires (Tang et al. 1999) (figure 1-4). La relâche des particules virales immatures se fait par bourgeonnement de la membrane plasmique. Les virions se retrouvent alors enveloppés d'une bicouche de phospholipides à laquelle vont s'associer SU et TM. Enfin, la protéase virale contenue dans Gag-Pol, activée par le bourgeonnement, clive les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol, ce qui permet la maturation complète des particules virales en particules matures et infectieuses (Frankel and Young 1998; Tang et al. 1999; Stevenson 2002).

1.2.3 Le génome de MuLV et son cycle de réplication

Le virus de la leucémie murine (MuLV) est un rétrovirus simple de la famille des gammarétrovirus dont le génome ne comporte que trois gènes soit *gag*, *pol* et *env* (figure 1-5). MuLV est un virus de mammifères de type C qui induit des lymphomes dans les cellules T de souris après une latence de quelques mois (pour une revue, voir Gardner 1978). Ce virus est bien caractérisé (Shinnick et al. 1981; Goff 1984; Tsichlis 1987; Jones et al. 1989) et son cycle de réplication est moins complexe que celui du VIH-1. En bref, lors de l'infection, le virus s'adsorbe sur un récepteur cellulaire, récepteur qui diffère selon la souche de MuLV. Pour la souche que nous avons utilisée, Moloney, il s'agit d'un transporteur cationique d'acides aminés appelé mCAT1. Suite à la fusion de son enveloppe avec la membrane cellulaire, il entre dans la cellule-cible, puis il est décapsidé. Son génome d'ARN simple brin est alors transcrit en ADN double brin grâce à sa transcriptase inverse. L'ADN viral entre dans le noyau lorsque la cellule est en mitose puis, il est intégré à l'ADN chromosomique cellulaire grâce à l'intégrase virale et transcrit. Il en résulte un ARNm de pleine longueur, codant pour les protéines structurales et enzymatiques et un ARNm épissé qui code pour les protéines de l'enveloppe virale.

Figure 1-4 : Schéma de l'organisation du virion immature et du virion mature. Dans le virion du VIH immature (à gauche), l'ARN viral, présent en deux copies simple brin, est entouré par les précurseurs Gag et Gag-Pol non-clivés et par une membrane lipidique contenant les protéines de l'enveloppe SU et TM. Certaines protéines accessoires comme Vpr sont aussi assemblées pour permettre le déroulement du cycle de réplication du VIH-1. Suite à la sortie des virions immatures, la protéase virale est activée, ce qui permet le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol et la réorganisation des virions. Dans le virion mature (à droite), l'ARN viral est lié par les protéines de la nucléocapside et est contenu dans le *core* du virion formé par les protéines de la capsid et p6. Le core, qui contient aussi les enzymes virales (RT, PRO et IN), est entouré par les protéines de la matrice. Comme le virion immature, le virion mature est bordé d'une double membrane lipidique contenant les protéines de l'enveloppe. Le virion mature est infectieux alors que le virion immature ne l'est pas (adapté de Oregon State University 2004).

Virion immature



Virion mature

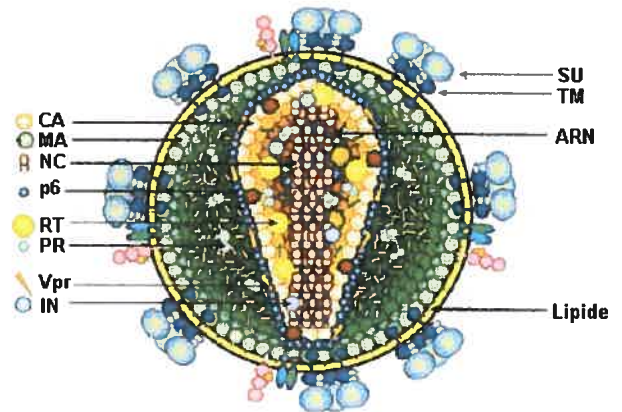


Figure 1-5 : Génome du virus de la leucémie murine (MuLV). MuLV étant un rétrovirus simple, son génome (8 kb) ne contient que trois gènes soit *gag*, *pol* et *env*. Comme pour le VIH-1, l'ARN viral de MuLV possède un LTR (*long terminal repeat*) qui contient des séquences régulatrices de l'expression des gènes viraux au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.



Les virions s'assemblent ensuite et sortent de la cellule infectée. Comme le VIH-1, MuLV contrôle rigoureusement l'expression de ses enzymes. Pour ce faire, il utilise la suppression programmée d'un codon de terminaison (*readthrough*) pour synthétiser le précurseur Gag-Pol. Les gènes *gag* et *pol* se trouvent dans le même cadre de lecture sur l'ARN de pleine-longueur du virus, mais séparés par un codon de terminaison (Alam et al. 1999). La majorité du temps, le précurseur Gag est exprimé par traduction conventionnelle. Cependant, dans 5% des cas, les ribosomes décodent le codon de terminaison du gène *gag* comme un codon glutamine, ce qui leur permet de poursuivre la traduction du gène *pol* et de produire le précurseur Gag-Pol.

1.3 Cibles potentielles pour le développement de thérapies contre le VIH

Depuis l'apparition du VIH, les scientifiques ont développé plusieurs médicaments pour prolonger la vie et améliorer la santé des personnes infectées par ce virus. Ces médicaments ciblent la transcriptase inverse virale et la protéase virale. Cependant, le virus développe facilement des résistances aux agents présentement utilisés, à cause de la transcriptase inverse qui ne corrige pas les erreurs, ce qui rend nécessaire la recherche de nouvelles cibles. Pour développer des nouvelles thérapies, il faut s'attaquer aux étapes importantes du cycle de réplication du VIH-1, comme l'entrée des virus, l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire et le *frameshift* programmé -1 permettant l'expression du gène *pol*.

1.3.1 Ciblage de l'entrée des virus

L'entrée du VIH-1 dans les cellules est une cible attrayante pour le développement de thérapies puisque le blocage de son entrée permet de limiter sa réplication et son infectivité. Comme c'est un processus complexe comportant plusieurs étapes, il existe plusieurs cibles potentielles pour bloquer l'entrée des virus (Este 2003). Du côté des cibles cellulaires, le ciblage des co-récepteurs cellulaires est intéressant (Zaitseva et al. 2003). En effet, il est impossible de cibler les récepteurs CD4 puisqu'ils sont indispensables au fonctionnement des cellules et que leur blocage entraînerait trop d'effets secondaires. Par contre, le co-récepteur CCR5 n'est pas essentiel pour la cellule puisque les individus dont les CCR5 ne sont pas fonctionnels sont sains. L'expression de ce co-récepteur pourrait, par exemple, être inhibée par la méthode d'interférence à l'ARN. Cependant, il existe plusieurs controverses au sujet de l'utilisation du co-récepteur CCR5 comme cible pour développer des agents antiviraux, la plus importante concernant le risque de causer l'apparition de virus plus infectieux utilisant un autre co-récepteur pour leur entrée dans les virus (Mosier et al. 1999; Trkola et al. 2002). De plus, il faut être extrêmement vigilant lorsque les agents agissent sur des cibles cellulaires et il faut s'assurer qu'ils n'entraînent pas d'effets secondaires plus graves que la maladie qu'ils contrent. Du côté des cibles virales, les protéines de l'enveloppe SU et TM codées par le gène *env* du VIH-1 constituent des cibles intéressantes. Il est possible de développer des agents empêchant la liaison de SU aux récepteurs et co-récepteurs cellulaires ou de développer des inhibiteurs de fusion, c'est-à-dire des agents se liant au niveau du peptide de fusion de la protéines transmembranire (TM) et pouvant empêcher la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. (Root and Hamer 2003). Des agents répondant à ces critères ont été développés et sont présentement testés en phase clinique (Dragic et al. 2000; Este 2003; Huang et al. 2003). L'enfuvirtide (T-20 ou Fuseon) a même été approuvé par la *US Food and Drug Administration* comme inhibiteur de l'entrée virale et est actuellement utilisé comme traitement pour des patients infectés par des souches de virus résistantes aux inhibiteurs de

la tri-thérapie (Este 2003). Cependant, l'enfuvirtide est un peptide de grande taille qui doit être administré par injection deux fois par jour. Il reste donc beaucoup de travail à faire pour développer un inhibiteur de l'entrée virale peu coûteux pouvant être administré par voie orale. De plus, les agents anti-VIH ciblant l'entrée du virus risquent d'entraîner le développement d'une résistance au même titre que les inhibiteurs présentement utilisés.

1.3.2 Ciblage de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire

L'intégrase virale est l'une des trois enzymes codées par le gène *pol*. Elle permet l'intégration du génome viral dans l'ADN chromosomique de la cellule-hôte, une étape essentielle au cycle de réplication du VIH-1. Lorsque l'intégrase virale est mutée au niveau de certains résidus-clés de son site actif, la réplication du virus est fortement diminuée (Dayam and Neamati 2003). L'utilisation d'inhibiteurs de l'intégrase comme cible antivirale est donc prometteuse, d'autant plus qu'aucun équivalent de cette enzyme n'a été trouvé chez l'homme. Comme la réaction catalysée par l'intégrase est unique, les inhibiteurs de cette enzyme ne devraient pas interférer avec le fonctionnement normal des cellules et devraient être peu toxiques. Durant les deux dernières années, les recherches effectuées pour développer des inhibiteurs d'intégrase comme les acides dicétoniques (DKA) (Marchand et al. 2002) montrent que cette enzyme est effectivement une cible intéressante (Nair 2002; Dayam and Neamati 2003; Nair 2003). Cependant, le mécanisme d'action de certains des inhibiteurs de l'intégrase n'est pas complètement élucidé et plusieurs ne sont pas spécifiques à l'intégrase virale. Toutefois, plusieurs inhibiteurs de l'intégrase virale fonctionnent efficacement *in vitro* et certains sont même rendus en essais cliniques (Hazuda et al. 2004; Johnson et al. 2004). Le développement d'agents anti-VIH ciblant l'intégrase virale est donc prometteur.

1.3.3 Ciblage du frameshift programmé -1

Plusieurs rétrovirus, dont le VIH-1, utilisent un *frameshift* programmé -1 pour produire le précurseur des enzymes virales, Gag-Pol. Cela lui permet de maintenir un rapport Gag-Pol/Gag d'environ 5%, crucial pour l'infectivité des virions. Le *frameshift* est donc une cible intéressante pour le développement d'agents anti-VIH. On peut imaginer deux façons de cibler le *frameshift* programmé -1 : la première consiste à s'attaquer au ribosome lui-même et la deuxième, à la région de l'ARN viral portant les signaux nécessaires pour stimuler le *frameshift*. Des agents ciblant le ribosome ont été développés par notre équipe et diminuent effectivement la réplication virale dans des cellules en culture (Brakier-Gingras et al., 1998). Cependant, il est risqué de s'attaquer directement au ribosome, vu son importance pour la vie cellulaire. Les agents pourraient être toxiques ou interférer avec la production d'autres protéines qui ont besoin d'un *frameshift* programmé -1 pour être exprimées. Jusqu'à maintenant, on n'a découvert qu'un seul gène de mammifères qui utilise ce type de *frameshift* (Shigemoto et al. 2001) et, comme le produit de ce gène est impliqué dans le développement, on peut penser que l'utilisation d'agents anti-*frameshift* ne devrait pas affecter le fonctionnement d'un organisme adulte. Cependant, le séquençage du génome humain laisse présager que d'autres protéines pourraient être produites par *frameshift* programmé -1. Notre équipe s'intéresse maintenant à la deuxième option, c'est-à-dire au développement d'agents anti-*frameshift* dirigés contre l'ARNm du VIH-1.

1.4 Les mécanismes de traduction non-conventionnelle chez les eucaryotes

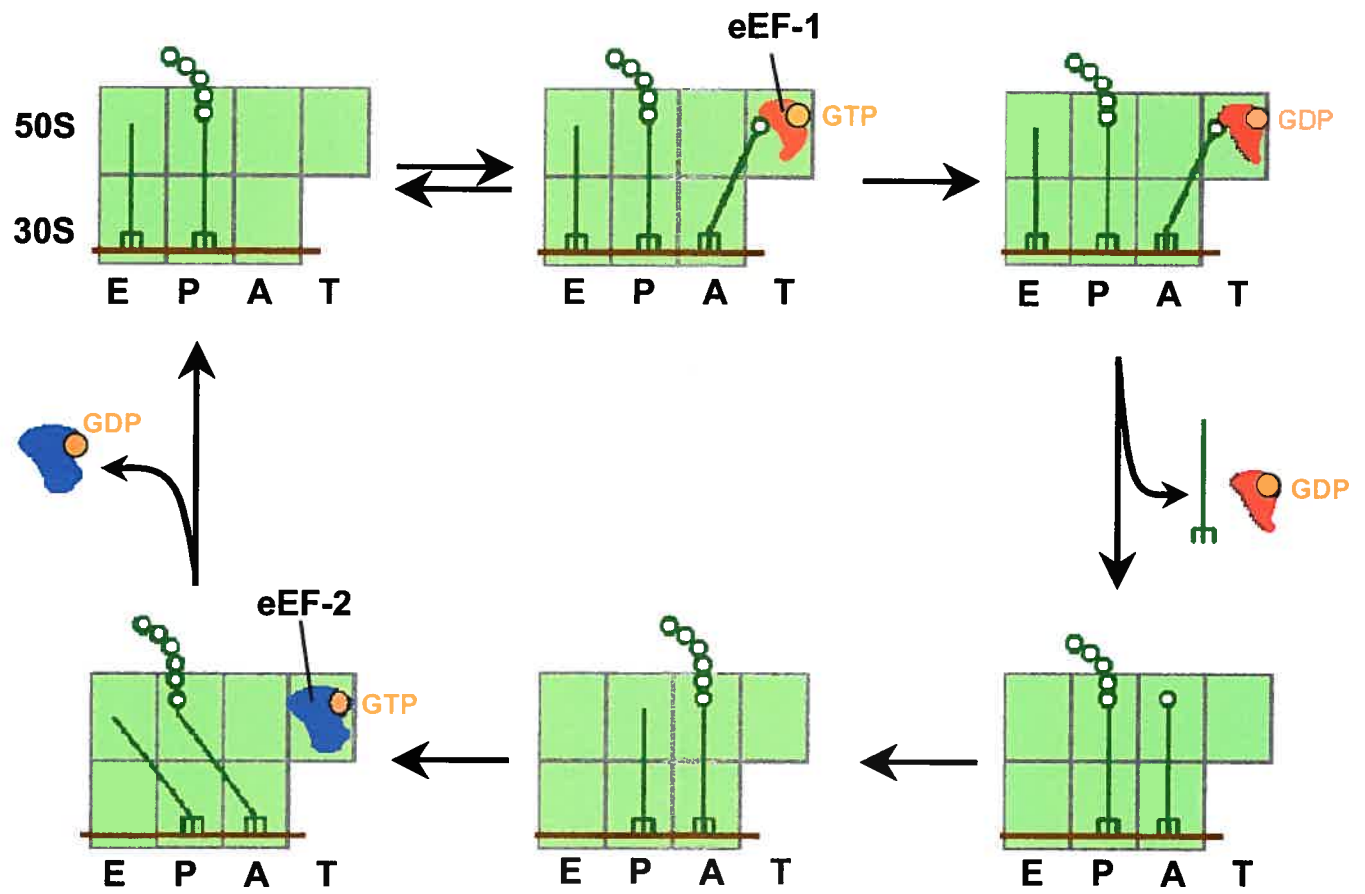
1.4.1 La traduction conventionnelle et le *recoding*

Le ribosome est un énorme complexe ribonucléoprotéique responsable de la traduction, c'est-à-dire de la biosynthèse des protéines. Le ribosome eucaryote est formé de deux sous-unités, la petite et la grande sous-unité (40S et 60S respectivement d'après leur coefficient de sédimentation), qui travaillent conjointement à traduire fidèlement et efficacement les ARNm. Ces deux sous-unités sont des ribonucléoprotéines, mais c'est l'ARN ribosomique (ARNr) qui est essentiel dans le fonctionnement du ribosome (pour une revue, voir Ramakrishnan 2002). Le ribosome synthétise les protéines en incorporant un à un les acides aminés en se basant sur les informations contenues dans l'ARNm. Pour ce faire, il décode l'ARNm par triplet de bases appelés codons, en commençant à un codon initiateur (AUG) et en terminant à un codon de terminaison (UAG, UGA ou UAA). Ce sont les ARN de transfert (ARNt) qui servent de molécules adaptatrices entre les codons et les acides aminés. En effet, chaque ARNt contient un anticodon de trois bases correspondant à un codon particulier et porte l'acide aminé associé à ce codon. Lorsque l'appariement codon/anticodon entre l'ARNm et l'ARNt est correct, le ribosome incorpore l'acide aminé porté par l'ARNt à la chaîne peptidique en croissance. Pour les deux premières positions du triplet, les règles pour l'appariement des bases entre un codon et l'anticodon de l'ARNt sont les règles classiques, dites Watson-Crick (A-U, G-C), alors que pour la troisième position, appelée position *wobble*, ces règles sont plus flexibles et permettent des appariements non Watson-Crick comme, par exemple, une paire de bases G:U. Le ribosome comporte trois sites principaux de liaison pour les ARNt, les sites A (aminoacyl), P (peptidyl) et E (exit). Le site A contient l'ARNt qui porte un acide aminé venant s'ajouter à la chaîne peptidique (aminoacyl-ARNt), le site P contient l'ARNt qui porte la chaîne

peptidique en croissance (peptidyl-ARNt) et le site E contient l'ARNt déchargé prêt à quitter le ribosome. Il y a aussi un site d'entrée des ARNt sur la 50S appelé site T (ternaire) puisque c'est le complexe ternaire qui s'y lie. Comme expliqué plus loin, le complexe ternaire comprend l'aminoacyl-ARNt lié au facteur d'élongation eucaryote 1 (eEF1) et une molécule de GTP.

La traduction d'un ARNm par le ribosome comporte trois étapes distinctes, soit l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chacune des étapes nécessite la participation de plusieurs facteurs cellulaires (Kapp and Lorsch 2004) dont il ne sera pas fait mention. Chez les eucaryotes, il existe deux types d'initiation soit l'initiation coiffe-dépendante et l'initiation interne. L'initiation coiffe-dépendante dépend d'une structure particulière située à l'extrémité 5' de l'ARNm appelée coiffe (pour une revue, voir Poulin and Sonenberg 2003). Des facteurs d'initiation se lient à la coiffe et recrutent le complexe de pré-initiation (43S) à l'extrémité 5' de l'ARNm. Le complexe 43S comprend la petite sous-unité ribosomique (40S), l'ARNt^{Met} initiateur portant une méthionine (Met-ARNt^{Met}) lié au site P de la 40S et des facteurs d'initiation. Ce complexe balaye la région 5' non-traduite de l'ARNm et s'arrête lorsqu'il rencontre un triplet initiateur AUG dans un contexte approprié. La grande sous-unité (60S) vient alors se lier à la petite sous-unité 40S pour former le ribosome (80S) qui pourra débiter l'élongation. Le deuxième type d'initiation, soit l'initiation interne, est moins fréquent que l'initiation coiffe-dépendante et est surtout utilisé par les virus. L'initiation interne dépend d'une séquence d'ARN hautement structurée appelée IRES (*internal ribosome entry site*) présente dans la région 5' non-traduite de l'ARNm. L'IRES recrute directement le complexe de pré-initiation (43S) sans avoir recours à tous les facteurs d'initiation nécessaire dans l'initiation coiffe-dépendante (pour une revue, voir Hellen and Sarnow 2001). Le ribosome est ensuite formé par l'association de la grande sous-unité, comme dans le cas de l'initiation coiffe-dépendante, et le ribosome est prêt à débiter un cycle d'élongation (figure 1-6). L'élongation consiste à allonger la chaîne peptidique en suivant les informations contenues dans l'ARNm jusqu'à la rencontre d'un codon de terminaison. D'abord, l'aminoacyl-ARNt se lie au site T de la

Figure 1-6 : Schéma des étapes de l'élongation de la traduction conventionnelle eucaryote. Le schéma montre les deux sous-unités du ribosome, 30S et 50S ainsi que les différents sites de liaison des ARNt soit E (exit), P (peptidyl), A (aminoacyl) et T (ternaire). Le complexe ternaire est formé par l'aminoacyl-ARNt associé avec le facteur d'élongation 1 (eEF1) lié au GTP. Lorsque ce complexe s'approche du ribosome, il se lie au site A/T. La complémentarité de la liaison codon/anticodon est alors vérifiée par le ribosome lui-même. Si cette complémentarité est correcte, eEF1 hydrolyse son GTP et quitte le ribosome, ce qui permet l'accommodation de l'aminoacyl-ARNt au site A/A et l'expulsion de l'ARNt déchargé présent au site E/E. L'étape suivante est le transfert du peptide du peptidyl-ARNt présent au site P/P à l'aminoacyl-ARNt présent au site A/A. La formation du lien peptidique entre le nouvel acide aminé et la chaîne peptidique en croissance se fait immédiatement après l'accommodation de l'aminoacyl-ARNt. La dernière étape du cycle d'élongation est la translocation. L'ARNt nouvellement déchargé et le nouveau peptidyl-ARNt se déplacent relativement à la 50S pour former les états hybrides, respectivement P/E et A/P. Le facteur d'élongation 2 (eEF2) lié au GTP s'associe à la 50S. Suite à l'hydrolyse de son GTP, eEF2 catalyse la translocation relativement à la 30S de l'ARNt déchargé au site E/E, d'où il sera éventuellement éjecté, et du peptidyl-ARNt au site P/P. Le ribosome est alors prêt pour un nouveau cycle d'élongation.



50S et s'installe au site A/T du ribosome sous forme de complexe ternaire avec le facteur eEF1 lié à une molécule de GTP. Dans cette nomenclature, la première lettre (A) correspond au site de la 30S tandis que la deuxième (T) correspond au site de la 50S. Durant cette étape, le ribosome vérifie les interactions codon/anticodon de façon à empêcher l'acceptation d'un mauvais aminoacyl-ARNt de façon définitive au site A/A du ribosome, c'est ce qui s'appelle l'accommodation. Si la complémentarité codon/anticodon est correcte, eEF1 hydrolyse son GTP et quitte le ribosome alors que l' aminoacyl-ARNt est accommodé au site A/A. Immédiatement après l'accommodation, il y a transfert du peptide en croissance du peptidyl-ARNt se trouvant au site P/P sur l'acide aminé de l' aminoacyl-ARNt au site A. Ensuite a lieu la translocation. Le nouveau peptidyl-ARNt et l'ARNt nouvellement déchargé se déplacent relativement à la 50S pour former les états hybrides, respectivement A/P et P/E. Le facteur d'élongation 2 (eEF2) lié à une molécule de GTP s'associe à la 50S. Suite à l'hydrolyse du GTP, eEF2 catalyse la translocation relativement à la 30S du peptidyl-ARNt au site P/P et de l'ARNt déchargé au site E/E, l'ARNt déchargé présent au site E/E ayant été préalablement expulsé du ribosome. Le ribosome est prêt à recommencer un deuxième cycle d'élongation. L'élongation se poursuit ainsi jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon de terminaison. C'est alors la troisième et dernière étape de la traduction qui consiste à terminer la traduction. Lorsqu'un codon de terminaison, UAA, UAG ou UGA, se trouve au site A du ribosome, le facteur de terminaison eucaryote 1 (eRF1) vient occuper ce site, empêchant ainsi la liaison d'un ARNt. En association avec le facteur de terminaison eucaryote 3 (eRF3), il déclenche l'hydrolyse du lien entre la chaîne peptidique et le peptidyl-ARNt auquel il est attaché. La chaîne peptidique quitte le ribosome, ce dernier quitte l'ARNm et les deux sous-unités se dissocient, prêtes à recommencer un nouveau cycle de traduction. Pendant l'élongation, le ribosome doit assurer la fidélité de la traduction et le maintien du cadre de lecture. Des mécanismes de correction des erreurs assurent la grande fidélité du ribosome, dont le taux d'erreur est de 5×10^{-4} par acide aminé incorporé (Kurland 1978). Cependant, l'expression de certaines protéines dépend d'erreurs de lecture durant la traduction de leur ARNm. Ces

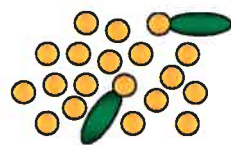
erreurs de lecture dites programmées, par opposition à des erreurs accidentelles, sont regroupées sous le nom de *recoding* puisqu'il s'agit d'une façon alternative de décoder l'ARNm. Le *recoding* dépend de séquences précises présentes sur les ARNm correspondant aux gènes en question, ARNm qui contiennent des signaux incitant le ribosome à faire une erreur de lecture précise. L'importance biologique du *recoding* est notable. Cela permet de contrôler l'expression de plusieurs protéines importantes chez différents organismes, incluant les virus (Brierley and Pennell 2001), les bactéries (Farabaugh 1996, 1997; Baranov et al. 2002), les levures (Namy et al. 2001) et les mammifères (Shigemoto et al. 2001). Trois catégories principales de *recoding* ont été identifiées jusqu'à présent à savoir le changement du cadre de lecture ou *frameshift*, la suppression de codon de terminaison ou *readthrough* et le saut du ribosome ou *hopping*. Le saut de ribosome est un mécanisme où, durant la traduction, le ribosome ne décode pas une séquence précise pouvant aller de deux à soixante nucléotides et poursuit l'élongation après avoir franchi cette séquence. Dans le cadre de cette étude, nous allons nous attarder sur l'importance du *recoding* pour les rétrovirus et nous allons détailler deux exemples de *recoding* soit celui du VIH-1 qui utilise un *frameshift* programmé -1 pour exprimer le gène *pol*, codant pour les enzymes virales, et celui de MuLV qui utilise un *readthrough* programmé à cette fin.

1.4.2 Rôle du *recoding* chez les rétrovirus

Comme mentionné plus haut, les génomes de tous les rétrovirus codent pour les gènes *gag*, *pol* et *env*. Les gènes *gag* et *pol* sont traduits à partir du même ARNm, *gag* par traduction conventionnelle et *pol* par *recoding*. Le *recoding* est utilisé par tous les rétrovirus et leur permet d'exprimer le précurseur des enzymes virales, Gag-Pol. Ce mécanisme de traduction non-conventionnelle est nécessaire pour les rétrovirus puisque, lorsque le *recoding* est aboli par des expériences de mutagenèse, la réplication virale est inhibée. Pour les rétrovirus, le *recoding* est un moyen efficace de contrôler l'expression

d'une protéine par rapport à une autre. Cela leur permet de maintenir un rapport Gag-Pol/Gag d'environ 5%, rapport critique pour la production de particules virales infectieuses (figure 1-7). Plusieurs recherches démontrent l'importance du *recoding* pour les rétrovirus. Chez MuLV, Felsenstein et al. (1988) ont remplacé le codon de terminaison situé entre *gag* et *pol* par un codon sens. Une expérience similaire a été faite chez le VIH-1 par Karacostas et al. (1993) qui ont créé un provirus mutant dont le génome contient un nucléotide supplémentaire dans la séquence glissante, ce qui place *pol* dans le cadre de lecture de *gag*. Dans ces deux cas, les mutants proviraux obtenus n'expriment que le précurseur Gag-Pol et ne produisent pas de particules virales infectieuses. Cela suggère que le rapport Gag-Pol/Gag est important pour l'assemblage des virions. Cependant, dans le cas du VIH-1, ces mutants ne produisent pas la protéine p6 présente dans l'extrémité C-terminale du précurseur Gag. Comme cette protéine est impliquée dans la relâche des virus, l'expérience de Karacostas *et al.* n'est pas entièrement concluante (Goila-Gaur et al. 2003). Par la suite, Hung et al. (1998) ont montré que le *frameshift* programmé -1 du VIH-1 est important pour l'assemblage des virions et pour la réplication virale en utilisant des agents stimulant le *frameshift* et augmentant le rapport Gag-Pol/Gag. Shehu-Xhilaga et al. (2001) ont aussi montré qu'une augmentation du rapport Gag-Pol/Gag affecte l'infectivité virale et la dimérisation de l'ARN du VIH-1. Pour ce faire, ils ont co-transfecté l'ADN proviral du VIH-1 dans des cellules de reins humains (HEK 293T) et un vecteur d'expression de Gag-Pol de façon à obtenir différents rapports Gag-Pol/Gag entre environ 1:1 et 1:20, ce dernier correspondant au rapport normal. Récemment, Biswas et al. (2004) ont muté la séquence glissante du VIH-1 pour montrer qu'une réduction de l'efficacité de *frameshift* du VIH-1 d'un facteur quatre diminue l'infectivité des virions d'un facteur cent. Les expériences de Hung et al., Shehu-Xhilaga et al. et Biswas et al. montrent que les rétrovirus doivent contrôler efficacement le rapport stoechiométrique entre les précurseurs Gag et Gag-Pol pour produire des particules virales infectieuses. En plus de servir au maintien du rapport Gag-Pol/Gag, les mécanismes de traduction avec *frameshift* et avec *readthrough*

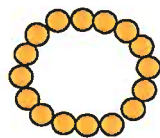
Figure 1-7 : Importance du rapport Gag-Pol/Gag pour l'infectivité des virions. Le maintien d'un rapport Gag-Pol/Gag d'environ 5% est nécessaire pour la production de particules virales infectieuses. Un excès de Gag ou de Gag-Pol entraîne la production de particules virales incomplètes.



Rapport Gag-Pol/Gag
normal (~5%)



Surplus
de Gag



Particule virale
incomplète

Surplus de
Gag-Pol



Particule virale
incomplète



Particule virale
infectieuse

impliquent que Pol est produit sous forme d'une protéine de fusion avec Gag ou une portion de Gag. Le précurseur Gag est un déterminant majeur de l'assemblage viral puisqu'il est capable à lui seul de former des particules virales même si elles ne sont pas infectieuses (Smith et al. 1990). La production de Pol sous forme de protéine de fusion avec Gag pourrait donc servir à faciliter l'incorporation des enzymes dans les virions via des interactions Gag-Gag (Buchsacher et al. 1999). Enfin, il est certain que le *recoding* peut être intéressant pour les rétrovirus dans le sens où il permet de coder pour deux protéines à partir d'un même ARNm. Étant donné que ces virus doivent contenir une vaste information dans le plus petit espace possible, il n'est donc pas étonnant qu'ils aient évolué de façon à utiliser un mécanisme de traduction non-conventionnelle. L'importance du *recoding* pour les rétrovirus en fait une excellente cible pour développer des agents anti-rétroviraux et particulièrement des agents anti-VIH. En effet, des agents qui augmentent ou diminuent l'efficacité du *recoding* peuvent interférer fortement avec le cycle de réplication virale et empêcher la production de particules virales infectieuses.

1.4.3 Le changement de cadre de lecture programmé (*frameshift* ribosomique)

Comme son nom l'indique, le *frameshift* ribosomique est un changement du cadre de lecture décodé par le ribosome durant la traduction d'un ARNm. Normalement, le cadre de lecture est fidèlement maintenu par le ribosome. Cependant, dans certains cas, le ribosome peut changer le cadre de lecture en glissant d'un nucléotide en 5' (*frameshift* -1) ou en 3' (*frameshift* +1). Il existe deux catégories de *frameshift* soit le *frameshift* aléatoire et le *frameshift* programmé. Le *frameshift* aléatoire est une erreur du ribosome qui mène à la production d'une protéine aberrante, due généralement à une terminaison prématurée sur un codon de terminaison décalé par rapport au cadre de lecture normale de la protéine. Le taux de *frameshift* aléatoire est très faible, soit entre 3×10^{-5} et 10^{-4} par codon (Parker 1989; Rodnina and Wintermeyer 2001). Par contre, le *frameshift* programmé est une erreur

programmée du ribosome qui est stimulée par des signaux présents sur l'ARNm. Le produit obtenu par *frameshift* programmé est généralement une protéine essentielle au fonctionnement d'un organisme. Le taux de *frameshift* programmé est plus élevé que le taux de *frameshift* aléatoire et varie entre 1 et 50% selon les ARNm et les organismes. Les *frameshifts* +1 et -1 utilisent des mécanismes complètement différents. Les sections qui suivent décrivent le mécanisme du *frameshift* programmé -1, le mécanisme de traduction non-conventionnelle utilisé par le VIH-1.

1.4.3.1 Le *frameshift* programmé -1 chez les eucaryotes

Le *frameshift* programmé -1 est utilisé par différents organismes notamment les virus de plantes, les levures et les virus des animaux, dont les rétrovirus (Farabaugh 1996, 1997). Contrairement au *frameshift* aléatoire qui peut se produire n'importe où sur l'ARNm, le *frameshift* programmé -1 se produit sur une région particulière de l'ARNm, composée d'une séquence glissante et d'un signal stimulateur séparés par un espaceur de quelques nucléotides (pour une revue, voir Brierley and Pennell 2001). La séquence glissante, où se produit le changement du cadre de lecture proprement dit, est un heptamère de type X XXY YYZ (les espaces correspondent au cadre de lecture 0 et les X, Y et Z désignent les bases du messager). Le motif répétitif de la séquence glissante est tel qu'il permet le réappariement des deux ARNt dans le cadre de lecture -1 lorsqu'on tient compte de la flexibilité permise pour la troisième paire de bases entre le codon et l'anticodon. Pour avoir un *frameshift* efficace chez les eucaryotes, les X de la séquence glissante peuvent être n'importe quelle base, les Y doivent être des A ou des U, et Z peut être n'importe quel nucléotide sauf un G (Brierley et al. 1992; Farabaugh 1997). L'espaceur peut contenir entre un et neuf nucléotides (Kollmus et al. 1996; Marczinke et al. 1998) et son rôle est probablement de positionner le signal stimulateur à un endroit approprié par rapport au ribosome. Dans la majorité des cas, pour les organismes eucaryotes, le signal stimulateur

est un pseudonoeud, c'est-à-dire une tige-boucle dont la boucle est appariée avec une région en aval de la tige pour former une deuxième tige séparée de la première par une deuxième boucle (pour un exemple de pseudonoeud, voir plus loin la figure 1-12). Lorsque la taille de l'espaceur est modifiée de seulement trois nucléotides pour une région de *frameshift* donnée, l'efficacité de ce *frameshift* est dramatiquement réduite, ce qui démontre son importance (Brierley et al. 1989). Immédiatement en aval de l'espaceur se trouve une structure secondaire d'ARN agissant comme signal stimulateur de *frameshift*. La présence de cette structure secondaire est nécessaire pour obtenir une efficacité maximale de *frameshift*. En effet, lorsque cette structure est mutée ou détruite, cela réduit considérablement le taux de *frameshift* (Jacks et al. 1988). Le signal stimulateur a pour rôle d'entraîner une pause du ribosome au niveau de la séquence glissante, ce qui donne la possibilité et le temps aux ARNt de changer de cadre de lecture (Jacks et al. 1988). Le ribosome doit dérouler le signal stimulateur pour pouvoir continuer l'élongation. La stabilité de la structure secondaire stimulatrice est importante pour la stimulation du *frameshift* puisqu'elle doit être assez stable pour ralentir suffisamment le ribosome durant l'élongation. Cependant, la pause du ribosome est nécessaire, mais non suffisante pour qu'il y ait stimulation d'un *frameshift* (Tu et al. 1992; Somogyi et al. 1993; Kontos et al. 2001). En effet, tous les pseudonoeuds capables d'induire une pause du ribosome ne sont pas nécessairement capables de stimuler un *frameshift*. Le signal stimulateur doit donc avoir un autre rôle que celui d'agir comme simple barrière pour le ribosome. On peut supposer que son rôle est aussi de faciliter le glissement des ARNt, soit en interagissant directement avec le ribosome, soit en interagissant avec un facteur cellulaire qui, lui, interagirait avec le ribosome. Jusqu'à ce jour, aucun facteur capable de lier des pseudonoeuds stimulateurs de *frameshift* n'a été trouvé (ten Dam et al. 1990; Dinman and Wickner 1992; Chen X. et al. 1995; Shen and Tinoco 1995), ce qui suggère que le signal stimulateur interagit directement avec le ribosome. Comme il est possible de stimuler le taux de *frameshift* accidentel en mutant l'ARNr, on peut penser qu'une interaction directe entre le signal stimulateur et l'ARNr puisse avoir le même effet (O'Connor and Dahlberg 1995; Tate et al. 1996). Jacks

et al. ont proposé le modèle du glissement simultané des deux ARNt pour expliquer le mécanisme du *frameshift* programmé -1 (Jacks et al. 1988) (figure 1-8). Selon ce modèle, lorsque le ribosome arrive au niveau de la séquence glissante, les deux ARNt présents aux sites P (codon XXY) et A (codon YYZ) du ribosome se détachent simultanément de l'ARNm. Les ARNt se déplacent alors d'un nucléotide vers l'extrémité 5', simultanément avec le ribosome et se réappariaient avec les codons du messenger dans le cadre de lecture -1 (codon XXX et codon YYY). Depuis, d'autres modèles ont été proposés, et sont décrits dans la section 1.4.3.2.2.

1.4.3.2 Le *frameshift* programmé chez les rétrovirus : cas du VIH-1

Les paragraphes qui suivent décrivent les particularités de la région où se produit le *frameshift* du VIH-1 ainsi que les modèles proposés pour expliquer le mécanisme de *frameshift* -1 de ce virus.

1.4.3.2.1 La région de *frameshift* du VIH-1

Dans le cas du VIH-1, la séquence glissante est l'heptanucléotide U UUU UUA. Il s'agit d'une séquence très glissante puisque l'ARNt situé au site P lors du glissement peut s'apparier parfaitement au codon du cadre de lecture -1 étant donné qu'il est identique au codon du cadre 0 (codon UUU). Quant à l'ARNt au site A, il se détache du codon UUA pour se réappairer au codon UUU. Contrairement à la majorité des cas de *frameshift* -1 chez les rétrovirus, le signal stimulateur du groupe M du VIH-1 n'est pas un pseudonoeud. Jusqu'à tout récemment, on pensait qu'il s'agissait d'une simple tige-boucle formée d'une tige de douze paires de bases surmontée d'une boucle de quatre nucléotides que nous appelons le signal stimulateur classique (figure 1-9) (Jacks et al. 1988; Kang 1998). Plus récemment, notre équipe a démontré que le signal est plus complexe, par des études de mutagenèse dirigée et des attaques chimiques à la RNase V1 du signal stimulateur du sous-

Figure 1-8 : Modèle du glissement simultané des ARNt proposé par Jacks et Varmus.
Avant la formation du lien peptidique entre l'acide aminé Leu porté par l'aminoacyl-ARNt présent au site A et la chaîne peptidique en croissance portée par le peptidyl-ARNt présent au site P, les deux ARNt se détachent simultanément de l'ARNm, glissent d'un nucléotide vers la gauche et se réappariant dans le cadre de lecture -1.

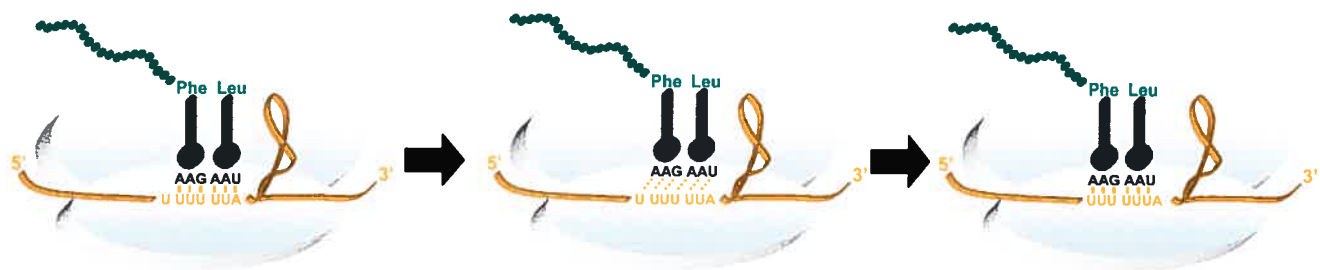
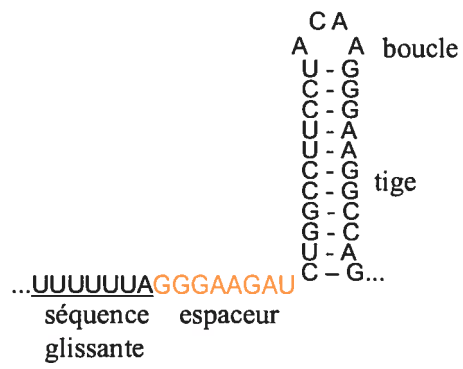
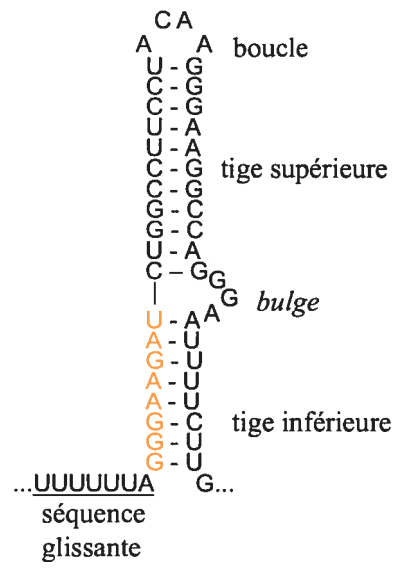


Figure 1-9 : La région de *frameshift* du sous-type B du groupe M du VIH-1. (A) La région classique de *frameshift* est composée d'une séquence glissante, UUUUUUA, suivie d'un signal stimulateur, séparés par un espaceur de huit nucléotides. La tige-boucle stimulatrice est formée d'une tige de onze paires de base et d'une boucle de quatre nucléotides. (B) La région complète de *frameshift* du VIH-1 est formée de la même séquence glissante qui est suivie par une tige-boucle allongée interrompue par une excroissance ou *bulge* de trois purines. La tige du bas contient huit paires de bases et la tige du haut, onze paires de bases. La portion supérieure du signal complet correspond à la tige-boucle classique. La portion inférieure du signal est formée par l'association de l'espaceur avec la région en aval de la tige-boucle classique.

A



B



type B du groupe M, le groupe prépondérant en Amérique du Nord et en Europe (Dulude et al. 2002). Ces expériences ont montré que l'espaceur de huit nucléotides séparant la séquence glissante de la tige-boucle classique s'associe avec la région en aval de cette tige-boucle. Il en résulte un signal allongé comportant deux tiges séparées par une excroissance ou *bulge* de trois purines. La portion supérieure du signal complexe correspond au signal stimulateur classique. La présence du signal complet augmente l'efficacité de *frameshift* -1 du VIH-1 d'un facteur deux. Dans un système utilisant un gène rapporteur dont l'expression dépend de la région de *frameshift* complète du VIH-1, Dulude et al. (2002) obtiennent une efficacité de *frameshift* de 4,8% contre une efficacité de 2,5% lorsque seule la tige-boucle classique est présente et de 0,2% lorsque le signal stimulateur est éliminé. Baril et al. (2003) ont montré par la suite que la structure en tige-boucle allongée était conservée chez les différents sous-types du groupe M. Dinman et al. (2002) avaient aussi observé que le signal stimulateur de *frameshift* du VIH-1 était plus complexe que la simple tige-boucle classique proposée. Toutefois, selon eux, une région en aval du signal classique s'associerait avec la boucle coiffant le signal classique pour former un pseudonoeud. Ce pseudonoeud serait stabilisé par la formation d'une hélice triple entre quelques nucléotides de la boucle engendrée par la formation de ce pseudonoeud et quelques nucléotides de la tige du signal classique. Cependant, ce signal stimulateur est improbable parce que l'orientation du troisième brin du triplex d'ARN est stériquement non favorable à la formation d'une structure en triple hélice. De plus, la structure proposée par Dinman n'est pas appuyée par les expériences de mutagenèse de Dulude et al (2002).

1.4.3.2.2 L'efficacité de *frameshift* du VIH-1

Différents chercheurs ont mesuré l'efficacité du *frameshift* produit par le VIH-1 en utilisant des gènes rapporteurs, comme la luciférase de la luciole, dont l'expression dépendait de la région de *frameshift* du VIH-1. Selon les systèmes utilisés, *in vitro* ou dans des cellules en culture, l'efficacité de *frameshift* varie entre 0,6% (Parkin et al. 1992) et 11% (Jacks et al. 1988). Les études *in vitro* donnent généralement des efficacités de

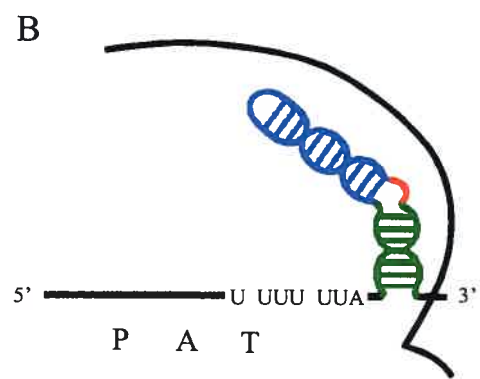
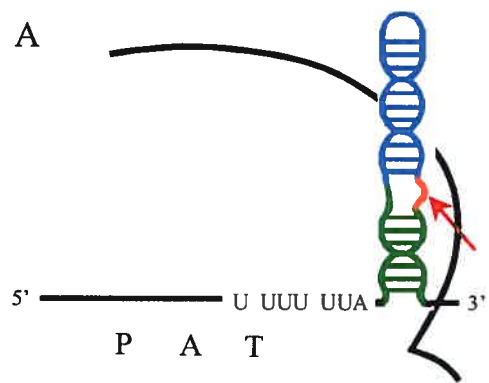
frameshift plus élevées que les études dans des cellules en culture, ce qui est probablement dû aux différences de cinétique de traduction entre les systèmes utilisés. Les études dans des cellules en culture observent généralement des efficacités de *frameshift* entre 4 et 6% selon les types cellulaires utilisés (Reil and Hauser 1990; Dulude et al. 2002; Baril et al. 2003; Biswas et al. 2004). Dulude et al. (2002) ont effectué des essais dans des cellules embryonnaires de rein humain (HEK 293T) en culture et ont obtenu une efficacité de *frameshift* d'environ 5% pour la région complète de *frameshift*.

Comme mentionné plus haut, l'efficacité de *frameshift* doit être rigoureusement contrôlée puisqu'elle est responsable du maintien du rapport Gag-Pol/Gag et qu'une faible variation du rapport affecte grandement le cycle de réplication du VIH-1. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme du *frameshift* programmé -1 du VIH-1 depuis la présentation initiale du mécanisme de glissement simultané des ARNt proposé par Jacks et al. Ces modèles ont été proposés suite à diverses expériences qui ont raffiné la compréhension que l'on avait de ce mécanisme. Même si la description traditionnelle du *frameshift* sous-entend que ce sont les ARNt qui se déplacent le long de l'ARNm lors du changement du cadre de lecture, c'est plutôt l'ARNm qui bouge relativement aux ARNt liés au ribosome. Aussi, des études basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de la catalyse du lien peptidique ont montré que le *frameshift* se produit avant la formation du lien peptidique entre l'acide aminé porté par l'aminoacyl-ARNt et la chaîne peptidique en croissance (Tumer et al. 1998; Harger et al. 2002; Meskauskas et al. 2003). Des chercheurs ont ensuite suggéré que le *frameshift* se produit avant l'accommodation de l'aminoacyl-ARNt (voir section 1.4.1) puisque la vitesse de formation du lien peptidique est extrêmement rapide suite à l'accommodation, ce qui ne laisse guère le temps au *frameshift* de se produire. Cela implique que l'aminoacyl-ARNt est en position A/T lors du changement du cadre de lecture (Farabaugh 1997; Brunelle et al. 1999). L'accommodation de cet aminoacyl-ARNt doit se faire dans le cadre de lecture -1 suite au glissement des ARNt. Dans le cas du VIH-1, cela pose un problème puisque la troisième paire de bases formées par l'interaction du codon du messager et de l'anticodon de l'aminoacyl-ARNt dans le cadre de lecture -1 correspond à

un mésappariement U-U. L'aminocyl-ARNt devrait donc être rejeté par le ribosome. Le contrôle traductionnel effectué par le ribosome pour vérifier la validité de l'interaction codon/anticodon doit donc être déjoué. Léger et al. (2004) ont suggéré que le signal stimulateur de *frameshift* induit une perturbation structurale dans le ribosome qui réduit spécifiquement le contrôle de la fidélité de la traduction ce qui explique que l'accommodation de l'aminocyl-ARNt soit possible dans le cadre de lecture -1 malgré le mésappariement. On ignore toutefois la façon dont le signal stimulateur exerce ce rôle. Des études ont montré que c'est la structure en hélice du signal stimulateur qui est importante pour la stimulation du *frameshift* et non la séquence nucléotidique des hélices (Jacks et al. 1988; Dulude et al. 2002). Léger et al. proposent que le signal lie le ribosome via une interaction hélice-hélice entre la tige-boucle stimulatrice et une des hélices de l'ARNr, même s'ils n'excluent pas une interaction entre le signal et une protéine ribosomique (figure 1-10). Cette interaction serait favorisée par le bulge riche en purines qui maintiendrait le signal dans une position spécifique. Des expériences de mutagenèse ont montré que le bulge est important pour la stimulation du *frameshift* (Dulude et al. 2002; Léger et al. 2004).

Comme mentionné plus haut, Jacks et al. avaient proposé le modèle du glissement simultané des deux ARNt. Cependant, Baranov et al. (2004) ont récemment suggéré qu'il n'y a pas de glissement simultané des ARNt dans les *frameshifts* programmés -1. En effet, cela impliquerait une coordination de la dissociation des deux ARNt de l'ARNm et il n'y a pas d'évidence pour appuyer cette hypothèse. Baranov et al. suggèrent plutôt que la dissociation du peptidyl-ARNt de l'ARNm précède celle de l'aminocyl-ARNt. Le peptidyl-ARNt dissocié peut soit se réassocier au codon du cadre de lecture 0, soit s'associer au codon du cadre de lecture -1, ce qui déclenche le changement du cadre de lecture. En effet, lorsque le peptidyl-ARNt se détache de l'ARNm, le segment de l'ARNm situé au site P peut se déplacer en direction 3', permettant au peptidyl-ARNt de se réappairer dans le cadre de lecture -1 grâce au motif de la séquence glissante. Ce déplacement laisserait un nucléotide non-pairé entre les sites A et P, ce qui doit être corrigé.

Figure 1-10 : Modèle de l'interaction entre le signal stimulateur de *frameshift* du VIH-1 et le ribosome proposé par Léger et al. (A) Le signal stimulateur de *frameshift* complet du VIH-1 rencontre le ribosome avant que la séquence glissante ne se trouve aux sites P et A. (B) Le *bulge* (en rouge) s'ancore au ribosome. Cet ancrage facilite une interaction spécifique entre la tige supérieure et le ribosome, interaction qui a pour rôle de faciliter le réappariement des ARNt dans le cadre de lecture -1 suite au changement de cadre de lecture (adapté de Léger et al. 2004).



Pour ce faire, ils proposent que l'ARNm situé au site A se déplace en direction 3' de façon à ce que l'aminoacyl-ARNt, présente au site A/T, se réapparie dans le cadre de lecture -1 où il est accommodé par le ribosome (figure 1-11). L'efficacité du *frameshift* serait donc déterminée par la différence de stabilité entre l'appariement codon/anticodon du cadre de lecture 0 et du cadre de lecture -1.

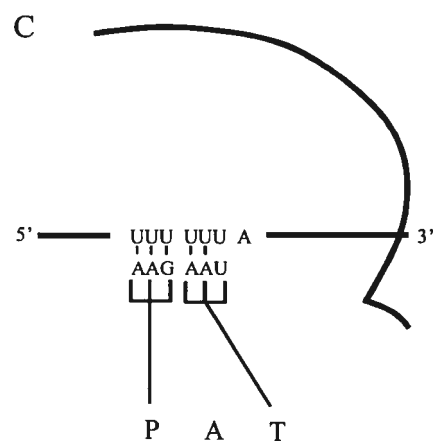
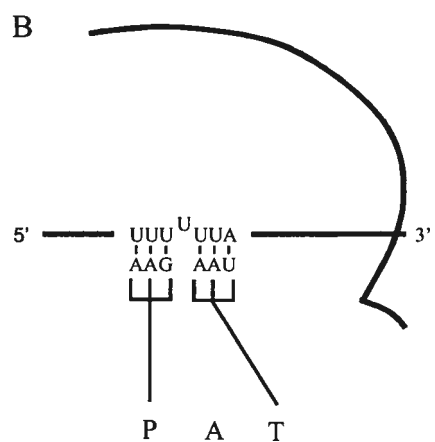
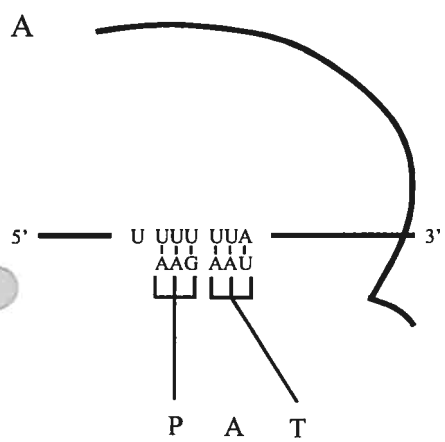
1.4.3.2.3 Le *frameshift* programmé, une cible intéressante pour développer des agents anti-VIH

Comme mentionné plus haut, le rapport Gag-Pol/Gag, maintenu par le *frameshift* -1, est nécessaire pour la production de particules virales infectieuses. La présence du signal stimulateur est cruciale pour obtenir l'efficacité de *frameshift* adéquate pour l'infectivité virale. Il serait donc intéressant de cibler le signal stimulateur pour développer des agents ciblant le *frameshift* du VIH-1. La liaison de courts peptides au signal stimulateur pourrait augmenter la pause du ribosome ou affecter les interactions spécifiques entre le ribosome et le signal stimulateur nécessaire. Cette liaison perturberait l'efficacité de *frameshift* et, par conséquent, le rapport Gag-Pol/Gag, affectant ainsi la réplication virale. Le signal stimulateur de *frameshift* du VIH-1 est donc une cible virale très intéressante. En effet, sa structure est conservée à travers les différents sous-types du groupe M, malgré des variations de leur séquence (Baril et al. 2003).

1.4.4 La suppression d'un codon de terminaison (*readthrough*)

La terminaison est une étape importante de la traduction marquant l'arrêt de la fabrication d'une protéine (pour une revue, voir Platt 1986). Les codons de terminaison

Figure 1-11 : Description du mouvement de l'ARNm lors d'un *frameshift* -1. Les sites P, A et T du ribosome ainsi que la séquence glissante du VIH-1 sont représentés. Le signal stimulateur de *frameshift* n'est pas représenté afin de clarifier la figure. (A) Avant l'accommodation, le peptidyl-ARNt occupe le site P/P et l'aminoacyl-ARNt se trouve au site A/T. (B) La liaison codon/anticodon entre l'ARNm et le peptidyl-ARNt est détruite, ce qui initie le *frameshift* en permettant à l'ARNm de se déplacer en direction 3'. Le motif de la séquence glissante permet au peptidyl-ARNt de s'apparier au codon du cadre de lecture -1. Ce premier mouvement de l'ARNm laisse un nucléotide non-apparié dans l'ARNm entre les sites P et A. (C) L'aminoacyl-ARNt peut alors se détacher de l'ARNm pour permettre un deuxième mouvement de l'ARNm dans la direction 3'. L'aminoacyl-ARNt s'apparie au codon du cadre de lecture -1 et doit être accommodé au site A dans ce cadre de lecture.



sont reconnus par le facteur de terminaison eucaryote eRF1 lorsqu'ils se trouvent dans le site A du ribosome. La liaison d'eRF1, en association avec eRF3, un autre facteur de terminaison, entraîne l'arrêt de la traduction, le détachement de la chaîne peptidique du peptidyl-ARNt et la dissociation du ribosome de l'ARNm. La suppression d'un codon de terminaison (*readthrough*) par le ribosome, c'est-à-dire la lecture d'un codon de terminaison comme un codon sens, est une erreur qui se produit peu fréquemment soit 10^{-4} par codon (Farabaugh 1997). Cet échec aléatoire de la terminaison allonge la protéine synthétisée d'une portion de protéine non fonctionnelle qui peut affecter par exemple le repliement de cette protéine. Cependant, dans certains organismes, la suppression de la terminaison est nécessaire pour traduire une séquence d'ARNm. On parle alors de *readthrough* programmé. En effet, certaines séquences codantes se trouvent juxtaposées sur un même ARNm et séparées uniquement par un codon de terminaison. Si le gène en aval ne possède pas de codon initiateur au début de sa séquence codante, il dépend du *readthrough* programmé du codon de terminaison du premier gène pour être exprimé. Contrairement au *readthrough* aléatoire qui se produit accidentellement avec une très faible efficacité, le *readthrough* programmé est stimulé par des éléments structuraux présents sur l'ARNm en question et mène à la production d'une protéine détectable et fonctionnelle. Lors d'un *readthrough* programmé, le codon de terminaison est décodé comme un codon sens par un ARNt suppresseur, un ARNt chargé d'un acide aminé qui interagit avec un codon de terminaison et incorpore un acide aminé à la chaîne peptidique en croissance (voir plus loin pour une description plus détaillée des ARNt suppresseurs). L'efficacité du *readthrough* dépend de la compétition entre l'ARNt suppresseur et le facteur de terminaison eRF1 pour la reconnaissance du codon de terminaison. La présence d'un ARNt suppresseur n'est cependant pas suffisante pour avoir une efficacité adéquate de *readthrough* programmé. En effet, l'ARNm doit aussi contenir une séquence particulière en 3' du codon de terminaison. Cette séquence agit comme signal stimulateur et peut s'étendre de quelques nucléotide à plusieurs nucléotides formant une structure secondaire complexe tel un pseudonoeud (Buckingham 1994; Beier and Grimm 2001). La structure du codon de terminaison, son

contexte, l'abondance d'eRF1 et l'abondance des ARNt suppresseurs sont les principaux éléments influençant l'efficacité du *readthrough*. Dans les sections qui suivent, le mécanisme de *readthrough* programmé chez les eucaryotes est décrit puisque c'est un mécanisme de traduction non-conventionnelle utilisé par le virus de la leucémie murine (MuLV).

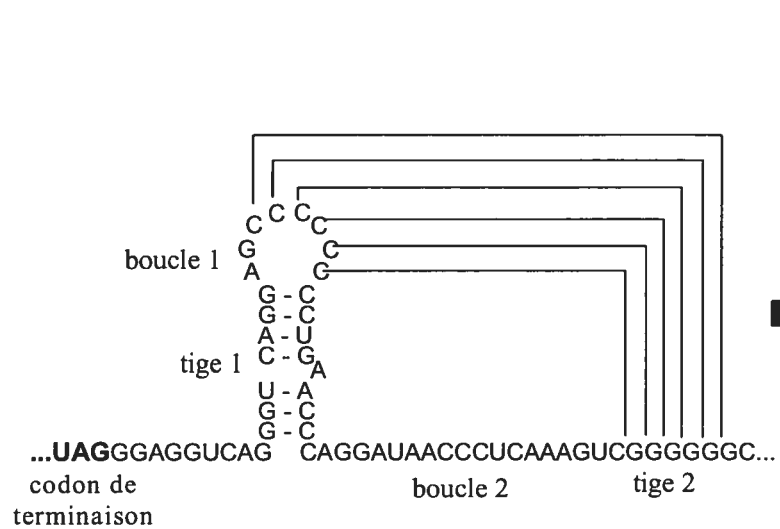
1.4.4.1 Le *readthrough* programmé chez les eucaryotes

Le *readthrough* programmé est utilisé par plusieurs organismes, comme la drosophile, la levure, les virus de plantes et les virus animaux pour contrôler l'expression de gènes (Farabaugh 1997). Chez les eucaryotes, il existe deux types de régions de *readthrough* programmé classées selon les similarités du contexte du codon de terminaison soit les régions simples et les régions complexes. Les régions simples sont très courtes et consistent principalement en un codon de terminaison dans un contexte très défavorable pour la terminaison. Dépendamment des organismes, le codon de terminaison est immédiatement suivi en 3' de CGG ou de CUA ou d'une séquence de type CAR YYA (où R est une purine et Y une pyrimidine) (Beier and Grimm 2001; Harrell et al. 2002). Quant aux régions complexes, elles s'étendent sur plusieurs dizaines de nucléotides et sont relativement semblables aux régions de *frameshift* programmé -1 puisque la région en aval du codon de terminaison forme une structure secondaire, souvent un pseudonoeud, qui est séparée du codon de terminaison par un espaceur de quelques nucléotides. Le *readthrough* permettant l'expression du précurseur Gag-Pol de MuLV se produit sur une région complexe de *readthrough* (figure 1-12).

Un élément influençant l'efficacité de *readthrough* est le codon de terminaison lui-même et son contexte même si cet effet est beaucoup plus important dans le cas des régions simples de *readthrough* (Buckingham 1994; Mottagui-Tabar et al. 1998; Cassan and Rousset 2001). Dépendamment de leur contexte, les codons de terminaison ne sont pas tous

égaux. Certains codons de terminaison sont forts, déclenchant efficacement la terminaison, alors que d'autres codons de terminaison sont faibles, favorisant le *readthrough*. Malgré cela, dans la nature, les trois codons de terminaison (UGA, UAG et UAA) sont utilisés pour faire un *readthrough* programmé, UGA étant le codon le plus utilisé et UAA, le moins utilisé. Cependant, il a été montré que, chez les organismes utilisant des régions complexes de *readthrough*, le remplacement du codon de terminaison normalement utilisé pour la suppression par les deux autres codons n'affecte pas l'efficacité de *readthrough*. L'identité du nucléotide immédiatement en 3' du codon de terminaison, appelé le nucléotide +4, peut exercer une influence sur l'efficacité du *readthrough*, particulièrement dans les régions simples (Brown et al. 1993). Dans des cellules eucaryotes, la suppression d'un codon de terminaison est généralement plus efficace lorsque le nucléotide +4 est une cytidine (C > G > U = A) (McCaughan et al. 1995). Chez certains organismes, comme la levure, le nucléotide immédiatement en 5' (nucléotide -1) du codon de terminaison semble également influencer l'efficacité du *readthrough*, une adénine en 5' étant associée à une bonne efficacité de *readthrough* et les pyrimidines, à une faible efficacité. Cependant, Kohli et Grosjean (1981) ont montré que, chez plusieurs organismes utilisant une région complexe de *readthrough*, le contexte des codons de terminaison utilisés pour faire un *readthrough* est le même que celui de codons de terminaison capable de déclencher efficacement la terminaison. Cela implique que le contexte du codon de terminaison n'est pas un élément déterminant de l'efficacité de *readthrough* des régions complexes. En fait, c'est plutôt l'abondance d'eRF1 et des ARNt supprimeurs qui affectent l'efficacité de *readthrough* de ces régions. Dans le cas des *readthroughs* programmés, les ARNt supprimeurs utilisés sont les ARNt qui reconnaissent normalement des codons sens par une interaction codon-anticodon parfaite, mais qui reconnaissent les codons de terminaison par une interaction codon-anticodon

Figure 1-12 : La région de *readthrough* de MuLV. La région de *readthrough* de MuLV est composée d'un codon de terminaison UAG, suivie d'un espaceur de huit nucléotides et d'un signal stimulateur en forme de pseudonoeud. La tige 1 du pseudonoeud possède huit paires de bases, la boucle 1, un nucléotide, la tige 2, sept paires de bases et la boucle 2, dix-huit nucléotides.



presque parfaite, c'est-à-dire deux appariements parfaits sur trois (Hatfield et al. 1990) (figure 1-13). La liaison entre un codon de terminaison et ce type d'ARNt suppresseur comporte donc une interaction base-base non-conventionnelle comme des paires non-Watson-Crick G:U ou un encombrement stérique (*clash*) comme une paire A:G. La stabilité de l'interaction codon-anticodon, même imparfaite, joue un rôle important dans l'efficacité du *readthrough*. Il est possible que le rôle du signal stimulateur soit de stabiliser cette interaction codon/anticodon imparfaite de façon à favoriser le *readthrough*. Le signal pourrait, par exemple, entraîner des distorsions dans l'ARNm, altérant la reconnaissance du codon de terminaison par les facteurs de terminaison et facilitant la reconnaissance par les ARNt suppresseurs (Beier and Grimm 2001). Il est aussi possible que les signaux interagissent directement avec eRF1, diminuant son affinité pour le codon de terminaison, ce qui favorise l'ARNt suppresseur même si l'appariement n'est pas parfait (Cassan and Rousset 2001).

1.4.4.2 Le *readthrough* programmé chez les rétrovirus : cas du MuLV

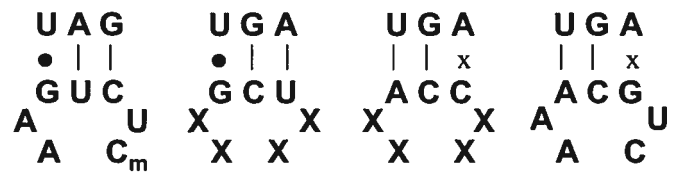
Chez MuLV, les gènes *gag* et *pol* se trouvent dans le même cadre de lecture, séparés par un codon de terminaison. Ce rétrovirus utilise donc un *readthrough* du codon de terminaison pour exprimer ses enzymes virales. La région de *readthrough* de MuLV est décrite dans les sections qui suivent et l'efficacité de ce mécanisme est discutée.

1.4.4.2.1 La région de *readthrough* de MuLV

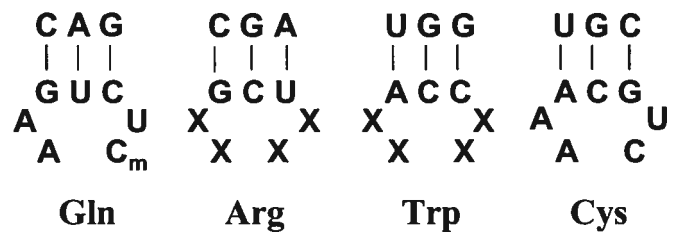
Dans le cas de MuLV, la région de *readthrough* est complexe (voir figure 1-12). Le codon de terminaison séparant les gènes *gag* et *pol*, UAG, est suivi par une région de 60 nucléotides en 3' du codon de terminaison qui est nécessaire pour assurer une efficacité adéquate de *readthrough* (voir, Wills et al. 1991; Felsenstein and Goff 1992; Wills et al. 1994; Alam et al. 1999). Cette région d'ARN se replie en pseudonoeud et est séparée du

Figure 1-13 : Comparaison des appariements entre l'anticodon de différents ARNt et un codon correspondant ou un codon de terminaison. Les paires de bases Watson-Crick sont indiquées par une ligne droite, les paires non-Watson-Crick sont indiquées par un point et les encombrements stériques (*clash*) sont indiqués par un X (adapté de Farabaugh 1997).

ARNt supprimeur



ARNt parfait



codon de terminaison par un espaceur de huit nucléotides. La tige 1 du pseudonoeud possède huit paires de bases, la boucle 1, un nucléotide, la tige 2, sept paires de bases et la boucle 2, dix-huit nucléotides. La structure de ce pseudonoeud a été étudiée par des expériences d'attaques chimiques et enzymatiques ainsi que par mutagenèse dirigée. Elle est semblable à celle de certains pseudonoeuds proposés pour d'autres rétrovirus utilisant un *readthrough* pour exprimer le gène *pol*, comme le virus endogène du babouin (BaEV) (Alam et al. 1999). La séquence et la taille de l'espaceur et de la boucle 2 sont particulièrement importantes pour la stimulation du *readthrough*. Plusieurs résidus de la boucle 2 sont conservés chez les rétrovirus utilisant un *readthrough*. Wills et al. (1994) suggèrent que ces résidus interviennent dans une interaction directe avec la tige 1. Il se pourrait cependant que ces résidus soient impliqués dans une interaction avec le ribosome. Aussi, il est à noter que le pseudonoeud de MuLV peut stimuler un *readthrough*, peu importe la nature du codon de terminaison présent à la jonction des gènes *gag* et *pol*. Le mécanisme de stimulation semble donc indépendant de l'identité de l'ARNt suppresseur nécessaire. Dans le cas de MuLV, le codon de terminaison UAG est lu dans environ 5% des cas comme un codon sens, par un ARNt suppresseur portant une glutamine et un anticodon GUC, ce qui implique un appariement non Watson-Crick U : G à la position *wobble*. Même s'il existe des ressemblances entre les pseudonoeuds stimulateurs de *frameshift* et ceux stimulateurs de *readthrough*, ils ne sont pas interchangeables. Le pseudonoeud de MMTV, un virus murin causant des tumeurs mammaires, qui stimule un *frameshift* programmé -1, ne stimule que faiblement un *readthrough* lorsqu'il est inséré à la place du pseudonoeud de MuLV. Ceci souligne le fait que le rôle de ces pseudonoeuds dans la stimulation du *recoding* n'est pas le même. En effet, un signal stimulateur de *frameshift* doit favoriser le réappariement des ARNt avec l'ARNm dans un autre cadre de lecture malgré des mésappariements alors qu'un signal stimulateur de *readthrough* doit favoriser la lecture d'un codon stop comme un codon sens par un ARNt suppresseur.

1.4.4.2.2 L'efficacité de *readthrough* de MuLV

Plusieurs groupes ont déterminé l'efficacité de *readthrough* obtenue avec la région de *readthrough* de MuLV, grâce à différents systèmes utilisant des gènes rapporteurs dont l'expression dépend de la région de *readthrough* de MuLV. Dépendamment des systèmes utilisés *in vitro*, les chercheurs mesurent une efficacité de *readthrough* variant entre 5% (Wills et al. 1991) et 10% (Philipson et al. 1978). Dans des cellules en culture, Orlova et al. (2003) ont déterminé un *readthrough* de 4,2% pour la région de MuLV.

Le mécanisme du *readthrough* est encore mal compris. Orlova et al. (2003) ont récemment découvert un mécanisme original utilisé par MuLV pour réduire l'efficacité de terminaison. Ils ont montré que la transcriptase inverse du virus affecte l'efficacité de la suppression du codon de terminaison en se liant au facteur de terminaison eRF1. La transcriptase inverse stimule ainsi l'expression de son précurseur, Gag-Pol, en diminuant l'efficacité de terminaison au profit du *readthrough*. Orlova et al. ont montré qu'eRF1 lie la transcriptase inverse de MuLV par une interaction directe protéine-protéine à deux endroits différents et que cette interaction inhibe l'activité de eRF1. Cette interaction est nécessaire pour la production de particules virales infectieuses puisque des virus dont la transcriptase inverse est mutée de façon à ce qu'elle soit incapable de lier eRF1 ne se répliquent pas efficacement. Quant au rôle précis du pseudonoeud de MuLV situé en aval du codon de terminaison, il n'est pas encore connu. L'hypothèse que nous favorisons est que le pseudonoeud interagit directement avec le ribosome de façon à stabiliser l'interaction codon/anticodon imparfaite entre le codon de terminaison et l'ARNt suppresseur au site A. Cette interaction affecterait le contrôle traductionnel effectué par le ribosome, pour favoriser la lecture du codon stop comme un codon sens par l'ARNt suppresseur.

1.5 Développement de modèles animaux pour l'étude d'agents anti-VIH

La pathogenèse causée par le VIH-1 n'est pas encore complètement comprise. Cependant, pour des raisons éthiques, plusieurs aspects de la maladie ne peuvent être étudiés directement chez des êtres humains. Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour étudier le VIH-1 dans un contexte se rapprochant le plus possible de son environnement naturel. En effet, les études dans des cellules en culture ne reflètent pas la complexité d'un organisme de mammifère vivant. De même, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour tester les nouveaux agents anti-VIH développés afin de s'assurer qu'ils sont aussi efficaces *in vivo* que dans des cellules en culture et qu'ils ne causent pas d'effets secondaires dangereux. Cependant, les petits animaux normalement utilisés en laboratoire comme le rat et la souris ne sont pas susceptibles à une infection par le VIH-1, ce qui complique le développement de modèles animaux pratiques (Cohen 2001). En effet, il existe certains blocages à la réplication du VIH chez ces animaux qui empêche le cycle viral de s'effectuer normalement, soit parce que ces animaux ne produisent pas un facteur essentiel au cycle viral, soit parce qu'ils produisent un facteur interférant avec le cycle viral. Dans les sections qui suivent, quelques modèles animaux existants pour l'étude du VIH-1 et d'agents anti-VIH sont décrits, à savoir le macaque, le rat et la souris.

1.5.1 Le macaque

Une méthode relativement aisée pour développer un modèle animal applicable à l'étude du VIH-1 est l'utilisation d'un virus de la même famille que le VIH, qui provoque une maladie dont le développement est similaire à celle causée par le VIH, mais qui possède un hôte différent de l'Homme. Le macaque peut être infecté par le virus de

l'immunodéficience simienne (VIS) et il s'agit d'un mammifère étroitement apparenté à l'Homme. (Sopper et al. 2002) De plus, le VIS et le VIH appartiennent au même sous-groupe de lentivirus, soit les virus de l'immunodéficience des grands primates. Leur organisation génomique et leur séquence génomique sont très similaires (Hahn et al. 2000) et leurs cibles cellulaires sont les mêmes, soit les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages (Desrosiers 1990). De plus, la maladie causée par le VIS est très semblable au SIDA, notamment dans la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et le dysfonctionnement du système nerveux central (Burudi and Fox 2001). Le macaque infecté au VIS est donc un excellent modèle animal. Cependant, ce modèle n'est pas parfait. D'abord, les macaques sont des gros animaux dont l'entretien est très coûteux. L'utilisation de macaques cause aussi d'importants problèmes d'éthique puisqu'ils sont étroitement apparentés à l'Homme. Enfin, la progression de la maladie est très lente et peut s'étendre sur des années, ce qui complique beaucoup le travail des chercheurs (McCune 1997). Pour toutes ces raisons, il est préférable de développer un modèle animal plus pratique, facile à manipuler et moins coûteux.

1.5.2 Le rat

Le rat est un petit animal couramment utilisé dans les laboratoires. En plus d'être de petite taille et d'avoir un court temps de gestation, il a un système immunitaire et un système nerveux bien caractérisés (Cohen 2001). L'utilisation d'un petit animal comme modèle permettrait d'augmenter le nombre de sujets pour chaque étude et réduirait grandement le temps d'attente pour obtenir des résultats. Le rat est devenu intéressant comme modèle animal pour l'infection par le VIH-1 lorsque des chercheurs ont réalisé que certaines lignées cellulaires de rat ne possèdent qu'un seul blocage à l'infection par le VIH-1, soit au niveau de l'entrée des virus. Pour surmonter ce problème, Reid et al. (2001) ont construit un rat transgénique exprimant un génome tronqué du VIH-1 comportant une délétion importante à la jonction des gènes *gag* et *pol*. La délétion comprend la région 3' de *gag* et la région 5' de *pol*. Grâce à cette délétion, les protéines régulatrices et accessoires virales sont exprimées, c'est-à-dire les protéines responsables en grande partie de la

pathogenèse associée au VIH-1. Comme elles sont sous le contrôle du LTR, les protéines virales produites chez ces rats transgéniques se retrouvent dans les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus et le sang, comme chez les Hommes infectés par le VIH-1. Les signes cliniques observés chez ces rats transgéniques correspondent aux symptômes du SIDA comme, par exemple, une déplétion des lymphocytes, un dysfonctionnement du système nerveux central, des problèmes neurologiques et des difficultés respiratoires. Il semble donc que ces rats transgéniques soient un modèle animal intéressant pour l'étude de la pathogenèse du VIH-1, mais non de son infection et de sa réplication. En 2002, Keppler et al. ont construit un autre type de rats transgéniques exprimant les récepteurs CD4 et co-récepteurs CCR5 humains dans des types cellulaires à savoir les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les microglies. Chez les rats possédant les transgènes CD4 et CCR5, les macrophages et les microglies étaient efficacement infectés par différentes souches de VIH-1, mais pas les lymphocytes T. Chez ces rats, le génome viral peut s'intégrer au génome cellulaire et les gènes viraux précoces sont transcrits. Ce modèle permet donc d'étudier dans un mammifère la réplication du VIH-1, la pathogenèse induite par ce virus et la réponse immunitaire face à une infection par le VIH-1. Cependant, ces modèles ne peuvent être utilisés pour étudier l'infection par le VIH-1 ni les effets d'agents anti-VIH sur l'infectivité.

1.5.3 La souris

La souris, comme le rat, est un petit mammifère souvent utilisé en laboratoire, qui est facile et peu coûteux à entreposer et à entretenir. Son génome et son système immunitaire sont bien caractérisés (Jamieson and Zack 1999; Cohen 2001). Cependant, la souris est résistante à l'infection par le VIH et la réplication du virus est bloquée en plusieurs endroits, dont l'entrée du VIH, la transactivation de la transcription du génome viral par Tat et l'empêchement de l'épissage de l'ARNm viral par Rev. Depuis plusieurs années, différents chercheurs travaillent à développer une souris permettant l'étude de l'infection par le VIH, de la pathogenèse induite par ce virus et de thérapies anti-VIH, ce

qui a abouti à la création de différentes souris transgéniques, de souris humanisées PBL-SCID-hu et de virus chimériques.

Pour rendre ces souris susceptibles au VIH-1, les chercheurs ont voulu créer une souris transgénique possédant les facteurs humains manquants pour permettre une infection efficace par le VIH (Cohen 2001). Le premier blocage à l'infection par le VIH chez la souris se situe au niveau de l'entrée du virus dans les cellules. En effet, les récepteurs CD4 et CCR5 murins ne permettent pas l'entrée du VIH. En 1997, Browning et al. ont montré que des souris transgéniques exprimant les CD4 et CCR5 humains sont susceptibles à l'infection par le VIH, mais la production virale est faible. Le deuxième blocage, se situant au niveau de la transcription du génome viral, a été résolu en 1999 par Kwak et al. Ces chercheurs ont montré que la cycline T1 murine ne peut interagir efficacement avec la protéine accessoire Tat, ce qui l'empêche de stimuler l'activation Tat-dépendante de la réplication virale (voir aussi Fujinaga et al. 2002). Une souris transgénique possédant le CD4 humain, le CCR5 humain et la cycline T1 humaine est plus susceptible à l'infection par le VIH, mais certains blocages demeurent (Mariani et al. 2000; 2001). Tout récemment, en 2003, Zheng et al. ont déjoué un troisième blocage ayant lieu au niveau de l'assemblage des virions. En effet, ils ont montré que la protéine humaine p32 peut empêcher l'épissage excessif de l'ARNm viral qui se produit chez les souris et qui empêchent le génome viral complet d'être assemblé dans les particules virales. La souris transgénique possédant tous ces facteurs humains devrait être capable de soutenir une infection par le VIH et s'avèrerait un modèle murin prometteur autant pour l'étude de l'infection par le VIH que pour l'étude de thérapie anti-virale.

D'autres chercheurs ont développé un autre genre de modèle murin pour l'étude du VIH. Il s'agit en fait d'intégrer le génome viral au génome murin afin que les protéines virales soient constitutivement traduites dans les cellules murines correspondant aux cellules humaines normalement infectées par le VIH (Cohen 2001). Le groupe de Jolicoeur a construit une souris transgénique contenant les séquences codantes complètes du VIH

(Jolicoeur et al. 1992; Hanna et al. 1998). Cette souris est capable de supporter une importante production des protéines virales, protéines qui se retrouvent dans les sites naturellement infectés par les rétrovirus. Il s'agit donc d'un modèle murin intéressant pour l'étude de la pathogenèse du VIH.

Une autre approche consiste à humaniser les souris. Pour ce faire, il faut transplanter des cellules et des tissus humains susceptibles à l'infection par le VIH dans des souris afin de créer une souris possédant un système immunitaire humain. Pour construire une souris humanisée, appelée SCID-PBL-hu, il faut transplanter des lymphocytes du sang circulant ou du sang de cordon ombilical humain (PBL-hu) dans la cavité péritonéale de souris souffrant d'une immunodéficience sévère combinée (SCID) (Mosier et al. 1988; McCune 1997; Jamieson and Zack 1999). Les souris SCID n'ont pas de lymphocytes B et T matures, ce qui permet aux lymphocytes humains de ne pas être rejetés et de se maintenir dans la souris. Plusieurs souches de VIH peuvent être introduites dans ces souris qui constituent alors un modèle intéressant pour l'étude de la pathogenèse virale. Cependant, ce modèle n'est pas parfait puisque la physiologie de ces souris humanisées est perturbée par la présence de facteurs murins. De plus, certains facteurs humains sont manquants.

Enfin, une autre stratégie pour développer un modèle murin permettant l'étude du VIH-1 est de construire des virus chimériques (McCune 1997). MuLV est un rétrovirus très bien caractérisé et apparenté au VIH-1 (Goff 1984). Il est possible de remplacer certaines parties de son génome par la portion correspondante du génome du VIH afin d'étudier le rôle ou le fonctionnement de cette région en particulier. Des portions du génome du VIH-1 peuvent être remplacées par des portions du génome du MuLV. Parallèlement, des portions du génome du MuLV peuvent être remplacés par des portions du génome du VIH-1. Cela a permis l'étude du fonctionnement des protéines virales produites par les gènes *gag*, *pol* et *env* (Berkowitz et al. 1995; Chen B. K. et al. 2001; Reed et al. 2002; Nack and Schnierle 2003). Cependant, ces modèles ne permettent pas l'étude de l'infection par le VIH ni de la pathogenèse. En conclusion, plusieurs modèles animaux existent, mais aucun n'est parfait,

chaque modèle présentant des avantages et des inconvénients. Il reste donc beaucoup de travail à faire pour développer un modèle animal pratique pour l'étude d'agents anti-VIH, mais les recherches sont prometteuses.

1.6 But de mon projet

Comme je l'ai mentionné, il est nécessaire de développer des nouveaux agents anti-VIH et le *frameshift* ribosomique qui contrôle la synthèse des enzymes du virus est une cible de choix. Pour évaluer l'effet des agents agissant contre ce *frameshift*, il est impératif d'avoir un modèle animal pratique et peu coûteux. Le but de mon projet est de développer un modèle murin pour l'étude d'agents ciblant le *frameshift* du VIH-1. Ma stratégie est de construire une chimère dérivée du MuLV, capable d'infecter les souris, pour laquelle la production du gène *pol* dépendrait de la région de *frameshift* du VIH-1. Comme d'autres chimères ont déjà été développées à partir du MuLV et du VIH-1, nous avons jugé que ce rétrovirus murin, qui est bien caractérisé, constitue un virus intéressant pour développer ce type de chimère. Une étude précédente effectuée par notre équipe a d'ailleurs montré qu'il était possible de construire une chimère du MuLV dans laquelle la production de Gag-Pol dépend du *frameshift* du VIH-1 plutôt que d'un *readthrough*. Pour ce faire, Brunelle et al. (2003b) ont inséré la région classique de *frameshift* du VIH-1 à la jonction des gènes *gag* et *pol* du MuLV de façon à placer *pol* dans le cadre de lecture -1 et ont inactivé le *readthrough* en remplaçant le codon de terminaison (UAG) par un codon glutamine (CAG). Les virions mutants obtenus suite à la transfection de fibroblastes de souris en culture pouvaient se propager de façon similaire aux virions sauvages, mais ces essais de propagation ne permettent pas de détecter de faibles défauts d'infectivité qui pourraient affecter la propagation des virions mutants *in vivo*. Pour qu'une telle chimère puisse être utilisée pour étudier l'effet d'agents anti-VIH, il serait important qu'elle contienne la région complète de *frameshift* du VIH-1. Mon projet a consisté à insérer la région complète de

frameshift du VIH-1 dans le génome de MuLV, de manière à ce que la production de Gag-Pol soit dépendante du *frameshift* plutôt que du *readthrough* normalement utilisé par ce virus, et à étudier l'infectivité de cette chimère. J'ai également construit, pour comparaison, une autre chimère en insérant la région de *frameshift* du sous-type B*, un variant naturel du VIH-1, dont le signal stimulateur est muté et moins efficace que le signal sauvage. J'ai ensuite étudié la propagation virale et l'infectivité des trois virus chimériques contenant la région classique de *frameshift*, la région complète sauvage ou la région complète mutée et j'ai comparé leur comportement à celui du virus sauvage. J'ai aussi examiné l'effet de l'insertion de la région de *frameshift* sur la maturation des protéines virales et sur la valeur du rapport Gag-Pol/Gag des virions obtenus avec les différentes constructions. Enfin, j'ai comparé l'efficacité de *readthrough* de MuLV et l'efficacité de *frameshift* de la région classique, complète sauvage et mutée dans un même système, en utilisant la luciférase de la luciole comme gène rapporteur.

Chapitre II:

The virion-associated Gag-Pol is decreased in chimeric Moloney murine leukemia viruses in which the readthrough region is replaced by the frameshift region of the human immunodeficiency virus type 1.

Karine Gendron¹, Dominic Dulude¹, Guy Lemay², Gerardo Ferbeyre¹ and Léa Brakier-Gingras^{1*}

Département de Biochimie¹ and Département de Microbiologie et Immunologie²,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

Soumis à la revue *Virology*

Contributions : Karine Gendron a effectué la majorité des expériences et Dominic Dulude a collaboré à des expériences de clonage pour les résultats présentés dans la figure 5.

Key-words: HIV-1; MuLV, ribosomal frameshift; Gag-Pol/Gag ratio

Abstract

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) requires a programmed -1 translational frameshift event to synthesize the precursor of its enzymes, Gag-Pol, when ribosomes from the infected cells translate the full-length viral messenger RNA. Translation of the same RNA according to conventional translational rules produces Gag, the precursor of the structural proteins of the virus. The efficiency of the frameshift controls the ratio of Gag-Pol to Gag, which is critical for viral infectivity. The Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) uses a different strategy, the programmed readthrough of a stop codon, to synthesize Gag-Pol. In this study, we investigated whether different forms of the HIV-1 frameshift region can functionally replace the readthrough signal in MoMuLV. Chimeric proviral DNAs were obtained by inserting into the MoMuLV genome the HIV-1 frameshift region encompassing the slippery sequence where the frameshift occurs, followed by the frameshift stimulatory signal. The inserted signal was either a simple stem-loop, previously considered as the stimulatory signal, or a longer bulged helix, now shown to be the complete stimulatory signal, or a mutated version of the complete signal with a three-nucleotide deletion. Although the three chimeric viruses can propagate essentially as the wild-type virus in NIH 3T3 cells, single-round infectivity assays revealed that the infectivity of the chimeric virions is about three to five-fold lower than that of the wild-type virions, depending upon the nature of the frameshift signal. It was also observed that the Gag-Pol to Gag ratio was decreased about two to three-fold in chimeric virions. Comparison of the readthrough efficiency of MoMuLV to the HIV-1 frameshift efficiency, by monitoring the expression of a luciferase reporter in cultured cells, revealed that the frameshift efficiencies were only 30 to 60% of the readthrough efficiency. Altogether, these observations indicate that replacement of the readthrough region of MoMuLV with the frameshift region of HIV-1 results in virions that are replication-competent, although less

infectious than wild-type MoMuLV. This type of chimera could provide an interesting tool for *in vivo* studies of novel drugs targeted against the HIV-1 frameshift event.

Introduction

The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), caused by the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), has killed over 21 million people since its appearance (Los Alamos National Laboratory 2002). The current therapy, based on the use of inhibitors of viral enzymes, is hampered by the emergence of resistant variants to these drugs (Coakley et al. 2000; Isel et al. 2001; LaBonte et al. 2003; Prabu-Jeyabalan et al. 2003). Novel antiviral drugs that target other steps of the viral replication cycle, such as viral entry, were recently developed (Clapham and McKnight 2002; Chantry 2004; Lee and Rossi 2004; Matthews et al. 2004). However, the virus also develops a resistance to these drugs (Miller and Hazuda 2004). Promising results were obtained in cultured cells with the RNA interference strategy (Berkhout 2004; Lee and Rossi 2004), but escape mutants were also isolated with this approach (Boden et al. 2003). It is therefore imperative to investigate other potential viral targets

The programmed translational frameshift event used by HIV-1 to produce Gag-Pol, the precursor of its enzymes (Jacks et al. 1988), is one potential target worth investigating. Gag, the precursor of the viral structural proteins, and Gag-Pol are both translated from the full-length viral mRNA, but are encoded in two different reading frames. Gag is synthesized according to conventional translation rules whereas Gag-Pol synthesis requires a -1 ribosomal frameshift during the translation of the messenger. This strategy allows the virus to maintain a specific Gag-Pol to Gag ratio, which is critical for particle assembly, RNA dimerization, viral replication and infectivity (Park and Morrow 1992; Karacostas et al. 1993; Hung et al. 1998; Shehu-Xhilaga et al. 2001). The synthesis of Gag-Pol depends upon two cis-acting elements, the slippery sequence where the shift occurs and a specific downstream secondary structure that acts as a frameshift stimulatory signal (reviewed in

Brierley 1995; Brierley and Pennell 2001). This secondary structure was long assumed to be a simple 11-bp stem-loop called the classic stimulatory signal (Jacks et al. 1988; Kang 1998). However, Dulude et al. (2002) showed that the stimulatory signal is more complex and consists in a longer stem-loop where the upper part corresponds to the classic stem-loop signal and the lower part results from pairing the spacer region following the slippery sequence and preceding the classic stem-loop with a complementary segment downstream of this stem-loop. A three-purine bulge separates the two parts of the helix. This bulged helix, which we name the complete frameshift stimulatory signal, stimulates the frameshift efficiency twice as much as the classic signal.

It will be interesting to develop novel anti-HIV-1 agents that perturb the frameshift efficiency and, consequently, the Gag-Pol to Gag ratio in HIV-1. However, assays with primates that are traditionally used for investigating anti-HIV drugs *in vivo* are very expensive and, most often, only small numbers of animals can be used, which limits the number of compounds that can be tested. It is therefore important to develop models using small mammals to assess *in vivo* the effects of potential anti-frameshift agents. We thus decided to construct a chimera of a murine retrovirus, the Moloney murine leukemia virus (MoMuLV), in which the frameshift region of HIV-1 directs the synthesis of the Gag-Pol polyprotein from MoMuLV. MoMuLV is a simple C-type murine retrovirus that induces T-cell lymphomas in susceptible mice after a latency of several months (reviewed in Gardner 1978). In this well-characterized virus (Shinnick et al. 1981; Goff 1984; Tschlis 1987; Jones et al. 1989), the *gag* and *pol* genes are in the same reading frame and the Gag-Pol polyprotein is expressed by a translational readthrough of the UAG stop codon at the end of the *gag* coding sequence. The UAG stop codon is followed at a distance of 8 nucleotides by a pseudoknot structure that acts as a readthrough stimulatory signal (Yoshinaka et al. 1985; Felsenstein and Goff 1988; Wills et al. 1991a; Felsenstein and Goff 1992b; Feng et al. 1992; Wills et al. 1994b; Alam et al. 1999). In a previous study, we constructed a chimeric MoMuLV in which we inserted the classic frameshift region of HIV-1. The construct was such that the synthesis of Gag-Pol depends upon a -1 frameshift rather than the readthrough

signal normally used by MoMuLV (Brunelle et al. 2003a). When NIH 3T3 cells were transfected with this chimeric proviral DNA, the mutated virus propagated about as well as the wild-type virus. However, the conditions of propagation in transfected NIH 3T3 cells could fail to detect small changes in infectivity that can affect viral propagation *in vivo*. In the present study, we constructed a chimeric MoMuLV containing the complete frameshift region of HIV-1 and another chimera containing a mutant of this complete signal with a three-nucleotide deletion. We then assessed the function of the HIV-1 frameshift signal in the three chimera by measuring the capacity of the viral particles produced with the chimeric proviral DNA to propagate in cultured cells and by monitoring their infectivity with a one-cycle infectivity assay. We also determined the ratio of Gag-Pol to Gag in the chimeric virions. In parallel, we compared the readthrough efficiency of the MoMuLV to the frameshift efficiency of HIV-1 using a reporter gene, the firefly luciferase, whose expression depended upon the readthrough region of MoMuLV or the classic, the complete and the complete mutated frameshift region of HIV-1. Altogether, the results obtained show that all the chimeric virions are replication-competent, but less infectious than the wild-type virus, a defect that can be directly correlated to a decrease in the Gag-Pol to Gag ratio, consistent with the lower efficiency of the frameshift compared to the readthrough.

Results

Description of the chimeras used in the study

In this study, we assessed the infectivity of a chimeric murine retrovirus for which the synthesis of Gag-Pol depends upon the HIV-1 frameshift region instead of the region responsible for the readthrough of a stop codon in MoMuLV. We had previously constructed such a chimeric provirus, pGMofs-short, which contains the complete proviral DNA of MoMuLV with the classic frameshift region of HIV-1 group M subtype B inserted between the *gag* and *pol* genes (Brunelle et al. 2003a). Here, we introduced the complete frameshift region of HIV-1 between the MoMuLV *gag* and *pol* genes, generating pGMofs-

long. We also investigated a third chimera, pGMofs-B*, which contains the frameshift region of a natural isolate of HIV group M subtype B, B*, where the frameshift stimulatory signal is mutated into a helix interrupted by an internal loop, consequently to a three-nucleotide deletion (Fig. 1). In all chimeras, the HIV-1 frameshift region is inserted between two cleavage sites of the viral protease so that the insertion is eliminated during the maturation of the viral proteins (Fig. 2). The Gag stop codon (UAG) where the readthrough occurs in the wild-type MoMuLV was replaced with a glutamine codon (CAG), thus minimizing the probability of reversion of the chimeric viruses if the inserted frameshift region were eliminated during viral replication. It can be noted that readthrough of the Gag stop codon in the chimeric construct would not have resulted in the expression of the *pol* gene that is now in a -1 frame relative to the *gag* gene. To replace the original stop codon of Gag and allow the production of Gag precursor, other stop codons were introduced in the (0) frame, as described in Materials and Methods (see Fig. 1).

The chimeric viruses can replicate in NIH 3T3 cells

To examine the replication of the chimeric viruses, we transfected cultured mouse fibroblasts permissive for MoMuLV replication (NIH 3T3 cells) with 5 μ g of the proviral DNA of either wild-type or chimeric MoMuLV. We examined the propagation of the virus in cultured cells by measuring the reverse transcriptase activity in the supernatants every third day during 15 days. Under these conditions, the propagation of the chimeric MoMuLV derivatives was similar to that of the wild-type MoMuLV (data not shown). These assays show that the chimeric murine viruses expressing *pol* via a frameshift event can replicate in cultured cells. An amplification by RT-PCR confirmed that the HIV-1 insertion was stable even after more than 30 days (data not shown) in culture. Although the replicative potential of the chimeric viruses appears to be normal in the propagation assays, minor differences which could affect the propagation of the virus in infected mice could be missed in these assays where the virions are produced in large amounts. Also, the

measurement of the reverse transcriptase activity could be misleading if the number of virion-associated reverse transcriptase molecules is altered in the chimeric virions.

In order to further quantify the replicative potential of the chimeric viruses, an alternative approach was considered. Culture media from cells chronically infected with either one of plasmids pGMo, pGMofs-short, pGMofs-long and pGMofs-B* were first harvested. The amount of viruses released was assessed by a quantitative protein dot blot assay, using an anti-p30 (CA) antiserum, which recognizes the Gag precursor and one of its cleavage products, the capsid (CA) protein. Equivalent small amounts of viruses were then used to infect NIH 3T3 cells for eight hours in presence of polybrene. Culture medium was harvested every day during 15 days and the amount of viruses released post infection was assessed by the dot blot assay monitoring the presence of Gag. It was observed that virus production in all three chimeras was reduced compared to the wild-type virus during this period of time, the decrease being about two to three-fold for pGMofs-long and pGMofs-short and four-fold for pGMofs-B* (Fig 3A), suggesting a decrease in the infectivity of the chimeric virions. The released virions were also analyzed for their content of Gag-Pol and for the processing of Gag (see later on). After a longer period of time, the differences in the virus production disappeared (data not shown).

Decreased infectivity of the chimeric virions in single-round infectivity assays

To further investigate the decrease of infectivity of the chimeras suggested with the replication assays described above, single-round infectivity assays (Wang and Goff 2003) were used. Proviral DNA (pGMo, pGMofs-short, pGMofs-long or pGMofs-B*) was cotransfected in 293FT cells with a murine retrovirus vector (SR α Luc) carrying firefly luciferase as a reporter gene (An et al. 1999). The chimeric or the wild-type MoMuLV acts as a helper virus that encapsidates the RNA corresponding to the luciferase gene. Equivalent volumes (normalized for the efficiency of transfection) of culture media of either the wild-type or the mutant virus were used to infect NIH 3T3 cells during one hour

in presence of polybrene and the infectivity corresponding to the helper viruses was monitored by measuring the luciferase activity in lysates of the infected cells 36 hours post-infection. It was found that, under these conditions, cells infected with the wild-type MoMuLV helper virus produce high levels of luciferase activity whereas luciferase activity was reduced by about three to five-fold in the cells infected with either one of the chimeric viruses (Fig. 3B). These assays therefore confirm that the chimeric viruses, in which the synthesis of Gag-Pol depends on a -1 frameshift, are infectious but show that their infectivity is decreased compared to the wild-type virus.

The processing of the Gag polyprotein is not affected but the Gag-Pol to Gag ratio is decreased in the chimeric virions

The processing of the Gag polyprotein and the amount of Gag-Pol incorporated relative to the amount of Gag was investigated in the chimeric virions released from the infected NIH 3T3 cells. The total amount of Gag contained in these virions had been quantified with a protein dot, as described above. To investigate whether there were changes in the processing of the Gag polyprotein, aliquots containing the virions released from NIH 3T3, as described above in the standard infectivity assays, were analysed by SDS-PAGE and by immunoblotting with the anti-p30 (CA) serum that detects Gag and the capsid protein. It can be seen (Fig. 4A) that the protein profiles obtained with all the chimeric virions are identical to that obtained with the wild-type virus, the Gag/CA ratio being about 10% for each type of viruses, indicating that the insertion of the HIV-1 frameshift region and the inactivation of the readthrough process do not affect the maturation of the Gag polyprotein (Fig. 4A). The amount of Gag-Pol incorporated in the released virions was assessed by measuring their associated reverse transcriptase activity, which indicates the total amount of Gag-Pol and one of its cleavage products, the reverse transcriptase. It was observed that the amount of Gag-Pol relative to Gag decreased by two to three-fold in the chimeric

viruses compared to the wild-type (Fig. 4B), suggesting that less Gag-Pol is synthesized during infection by the chimeric viruses.

Comparison of the readthrough efficiency of MoMuLV to the frameshift efficiency of HIV-1

The decreased Gag-Pol to Gag ratio observed in the chimeric virions suggests that the frameshift event is less efficient than the readthrough event. We therefore decided to use constructs with a heterologous reporter gene to compare the readthrough efficiency promoted by the readthrough region of MoMuLV to the frameshift efficiency corresponding to the frameshift regions of HIV-1 inserted in the chimeric MoMuLV. We introduced the readthrough region of MoMuLV in a vector containing the firefly luciferase gene under the control of a CMV promoter (Baril et al. 2003), generating pLUC/MoMuLV(readthrough), for which the insertion is such that the synthesis of luciferase depends upon the readthrough of the stop codon. A control construct, pLUC/MoMuLV(control), was made with an identical insertion except that the stop codon was replaced with a glutamine codon. The ratio of luciferase produced with pLUC/MoMuLV(readthrough) to that produced with the pLUC/MoMuLV(control) construct was used to assess the readthrough efficiency. For measuring the frameshift efficiency, the frameshift region of HIV-1, with the classic, complete or mutated stimulatory signal, was inserted at the beginning of the luciferase coding sequence such that only ribosomes that make a -1 frameshift synthesize the luciferase (see Fig. 5A). This insertion was followed by the inactivated readthrough region of MoMuLV so as to reproduce the situation encountered by the ribosomes when translating the viral mRNA in cells infected with the chimeric viruses. This generated pLUC/HIVshort-MoMuLV (-1), pLUC/HIVlong-MoMuLV (-1) and pLUC/HIVB*-MoMuLV (-1). A control in-frame construct was derived from each (-1) construct by inserting one base immediately downstream the slippery site, so that only ribosomes that do not make a frameshift synthesize the luciferase. The readthrough efficiency and the frameshift efficiency were

assessed in cultured 293FT cells by measuring the luciferase activity in lysates from cells transfected with the appropriate vectors (Fig. 5B). The readthrough efficiency of MoMuLV is 5.2%, a value comparable to those obtained previously with an appropriate heterologous reporter in cultured cells which were 3.7% and 4.2%. (Grentzmann et al. 1998; Orlova et al. 2003). We found that the frameshift efficiency of the complete frameshift region of HIV-1, the classic frameshift region and the frameshift region of subtype B* are respectively 2.9%, 1.5% and 1.3%, corresponding to about one-half to one-fourth of the readthrough efficiency. This lower efficiency of the frameshift event compared to the readthrough event can directly account for the lower Gag-Pol to Gag ratio in the chimeric virions.

Discussion

As indicated in the Introduction, the Gag-Pol to Gag ratio is known to be critical for virus replication and infectivity. Baril et al. (2003), who examined the frameshift efficiencies in all the subtypes of HIV-1 group M, found that these values fall within a narrow window, the maximal deviation being only 35% of the mean value. Increasing the Gag-Pol to Gag ratio in HIV-1 by as little as two to three-fold was sufficient to inhibit HIV-1 replication (Hung et al. 1998; Shehu-Xhilaga et al. 2001) and Biswas et al. (2004) recently showed that a four-fold decrease of frameshift efficiency decreased HIV-1 infectivity a hundred-fold. Also, Telenti et al. (2002) analysed HIV-1 mutants, altered in the upper stem-loop structure of the frameshift stimulatory signal, and found that viruses with more than 60% reduction in frameshift efficiency presented profound defects in viral replication and infectivity. In the case of MoMuLV, Felsenstein and Goff (1988) showed that, with a mutant of MoMuLV expressing only Gag-Pol but not Gag, there was no assembly and no release of viral particles. However, to our knowledge, there are no other data on the effect of a decrease or an increase in Gag-Pol/Gag ratio on MoMuLV infectivity. Studies with another retrovirus using a -1 ribosomal frameshift to synthesize Gag-Pol, the equine infectious anemia virus (Chen and Montelaro 2003), indicated that

mutations that reduced frameshift efficiency by as much as 50% continued to sustain viral replication, but that greater reductions in frameshifting efficiency led to replication defects.

Our aim was to construct a chimeric murine retrovirus whose replication depends upon the frameshift event of HIV-1, with the expectation that such a chimera could be used to study the effect of agents targeted against HIV-1 frameshift region in mice. Chimeric retroviruses in which regions of the genome of MoMuLV are replaced by the corresponding regions of HIV-1 genome (Kondo et al. 1995; Yuan et al. 2000) and in which regions of the genome of HIV-1 are replaced by the corresponding regions of MoMuLV (Chen B. K. et al. 2001; Reed et al. 2002) have been described. These chimeras were replication-competent in cultured cells but, in general, less infectious than the corresponding wild-type virus. Our results show that chimeric derivatives of MoMuLV producing Gag-Pol under the control of the frameshift region of HIV-1 are also less infectious than the wild-type. When NIH 3T3 cells are transfected with chimeric proviral DNA, enough infectious virions are formed under the conditions of transfection to sustain productive spread through the culture. However, infectivity assays show that, although the frameshift region of HIV-1 allows the production of Gag-Pol, the resulting viral particles are less infectious than the wild-type particles. Assessment of the frameshift efficiency for the chimeric viruses showed that it was decreased to one-fourth to one-half of the readthrough efficiency, accounting for the decrease in the Gag-Pol to Gag ratio observed in the chimeric virions and roughly correlating with the decreased virus infectivity. How a small change in the Gag-Pol to Gag ratio decreases the virus infectivity remains mysterious. We observed that the processing of Gag was not affected and it is known that the placement of the primer tRNA on the primer binding site does not require *pol* gene expression in murine retroviruses (Fu et al. 1997a). An attractive hypothesis is that the decreased infectivity of the chimeric virions results from an interference with the maturation of genomic RNA dimerization. Indeed, although the Gag protein is the major mediator of genomic RNA encapsidation and dimerization in HIV-1 and MoMuLV (Feng et al. 1999 and references therein; see Evans et al. 2004), the maturation of RNA dimerization is

known to be sensitive to the changes in the amount of Gag-Pol (Shehu-Xhilaga et al. 2002). In addition to this possible maturation problem, it must also be added that Orlova et al. (2003) recently demonstrated that MoMuLV reverse transcriptase is involved in the regulation of its own expression, by sequestering eRF1, the eukaryotic translation release factor 1 that recognizes stop codons, and, in association with the release factor eRF3, causes termination and polypeptide release from the ribosome. This interaction thus enhances the efficiency of readthrough (see also Goff 2004). Such trans-acting additional regulation mechanism for the control the Gag-Pol/Gag ratio is obviously missing in the chimeric viruses. The lack of this control could also contribute to affect the Gag-Pol to Gag ratio and the infectivity of the chimeras, for which the synthesis of Gag-Pol is not upregulated by RT.

In conclusion, our results demonstrate that chimeras derived from MoMuLV, where the synthesis of Gag-Pol depends upon the -1 ribosomal frameshift from HIV-1 are replication-competent, but less infectious than the wild-type virus. Among these chimeras, the one with the complete frameshift region of HIV-1 could represent an interesting tool to investigate agents targeted against the frameshift stimulatory signal. Although it is premature to predict the effect of the decreased infectivity when mice are infected with such a chimera, it is likely that this defect will delay the propagation of the chimeric virions. However, this should not prevent a comparison of virus propagation in mice in the presence or the absence of anti-frameshift drugs and an assessment of the efficiency of these drugs.

Materials and Methods

Construction of plasmids

Plasmid pGMo is a derivative of pGEM7Zf (Promega) that contains the proviral DNA of wild-type MoMuLV. Plasmid pGMofs-short is a derivative of pGMo in which the classic frameshift region of HIV-1 was inserted at the junction of the gag and pol genes,

such that the *pol* gene is in a -1 frame relative to the *gag* gene. In the readthrough region, the *gag* stop codon (UAG) where the readthrough occurs was mutated to a glutamine codon (CAG). Both plasmids were described previously (Brunelle et al. 2003a). In this study, we constructed plasmid pGMofs-long, that contains the complete frameshift region of HIV-1 group M subtype B (Genebank KO2007) at the junction of the *gag* and *pol* genes and pGMofs-B*, that contains the complete HIV-1 frameshift region with a mutated stimulatory signal, corresponding to a natural variant of HIV-1 (Genbank M17449), which we name subtype B*. Both pGMofs-long and pGMofs-B* were obtained from a plasmid derived from pGMofs-short, pGEMt-XhoMfe-short, by a standard PCR with four oligos (Ho et al. 1989) using the Vent DNA polymerase (New England Biolabs). Plasmid pGEMt-XhoMfe-short that had been derived from pGMofs-short to facilitate molecular cloning contains the portion of MoMuLV genome between the *Xho*I and *Mfe*I restriction sites. The PCR products obtained from pGEMt-XhoMfe-short were first introduced between the *Nru*I and *Age*I sites of pGEMt-XhoMfe-short to produce pGEMt-XhoMfe-long and pGEMt-XhoMfe-B* and the *Xho*I-*Mfe*I fragment of these plasmids was subsequently cloned in pGMofs-short to produce pGMofs-long and pGMofs-B*. The four oligos were respectively: extern-fwd: 5'-GAAGGAGGTCCC-AACTCGATCGCGACCAGTGTGCC-TACTG-3' extern-rev: 5'-GGTCCCATAACCTGAGCTCCTGATCCCTCAAAGTGG-ATTTGGGC-3' long-fwd: 5'-CAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAA-GGGAAGGCCAGGGAATTTCTTTAACCTCCCTCCTGACCCTAG-3', long-rev: 5'-CTAGGGTCAGGAGGGAGGTTAAAGAAAATTCCCTGGCCTTCCTTGTAGGAAGGCCAGATCTTCCCTAAAAAATTG-3' for the cloning of pGMofs-long and extern-fwd, extern-rev, B*-fwd: 5'-GGCCTTCCTGCAAGGGAAGGCGGAATTTTCCTCAACCTCC-3', B*-rev: 5'-GGAGGTT-GAGGAAAATTCC-GCCTTCCCTTGCAGGAAGGCC-3' for the cloning of pGMofs-B*. In all these chimeric constructs, the inserted frameshift region is bracketed between two sites of cleavage for the viral protease. The readthrough codon is also replaced with a glutamine codon (CAG). In all the chimeric constructs, there is a stop codon between the frameshift region and the readthrough region, at the

downstream site of cleavage by the MoMuLV protease, which allows the production of the Gag precursor. For the pGMofs-short and pGMofs-long, as a precautionary measure, an additional stop codon (UAG or UAA) had been created by mutagenesis in the spacer between the slippery sequence and the classic stem-loop and immediately after the frameshift region, respectively.

To compare the frameshift efficiency of each of the chimeric viruses to the readthrough efficiency of MoMuLV, we used a vector derived from pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen) containing the firefly luciferase coding sequence under control of a CMV promoter (described in Baril et al. 2003). The readthrough region of MoMuLV was inserted between the *Eco47III* and the *BamHI* sites of the vector, at the beginning of the luciferase coding region, such that luciferase production is dependent on a readthrough event, generating pLUC/MoMuLV (readthrough). The pLUC/MoMuLV(control) construct was made by replacing the readthrough stop codon by a glutamine codon so that luciferase is synthesized following conventional translation rules. The readthrough efficiency was calculated as the ratio of the luciferase activity (in %), measured as described below, with pLUC/MoMuLV(readthrough) to that with pLUC/MoMuLV(control). To measure the frameshift efficiency, we inserted the classic frameshift region of HIV-1 subtype B, the complete frameshift region of HIV-1 subtype B and the frameshift region of HIV-1 subtype B* followed by the readthrough region where the stop codon was replaced with a glutamine. This generated pLUC/HIVshort-MoMuLV (-1), pLUC/HIVlong-MoMuLV (-1) and pLUC/HIVB*-MoMuLV (-1), respectively. For these (-1) constructs, the *luc* sequence is in a -1 reading frame relative to the initiator codon so that a -1 frameshift is required to synthesize luciferase. For each (-1) construct, a corresponding in-frame (0) construct was made by inserting an adenine immediately downstream the slippery site so that luciferase is produced by conventional translation. The frameshift efficiency was calculated by dividing the level of luciferase activity produced with pLUC/HIV-MoMuLV (-1) constructs by the sum of the luciferase activity of the (-1) and the (0) control constructs (in %).

Quantitative analysis of viral replication

NIH 3T3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 15% (v/v) fetal bovine serum. Transient transfections were made in cells at 40% confluence in 100-mm plates as described above, with 5 μ g of pGMO, pGMofs-short, pGMofs-long or pGMofs-B* that contain the complete proviral DNA of either wild-type or chimeric MoMuLV. The cells were passaged every third day until they became chronically infected. To investigate viral replication and propagation, the culture media were harvested every three days during two weeks and centrifuged 10 minutes at 3000 rpm to remove cell debris. Viruses were pelleted by a one-hour centrifugation at 40 000 rpm in 50 Ti rotor (Beckman) and resuspended overnight at 4°C in 100 μ l of Tris-EDTA, pH 8.0. The virion-associated reverse transcriptase (RT) activity of the harvest was measured with a standard reverse transcriptase activity assay described below. Alternatively, chronically infected NIH 3T3 cells (100-mm dishes) at confluence were covered with a minimal volume (3 ml) of culture medium. Supernatants were harvested and replaced with fresh medium every two hours for eight hours and kept on ice until the last harvest. The harvests of each type of virus (pGMO, pGMofs-short, pGMofs-long or pGMofs-B*) were pooled and frozen at -80°C. Fresh NIH 3T3 cells at 20% confluence were infected for eight hours with an equal small amount of viruses diluted in 3 ml of culture medium, as measured by dot blotting with goat antiserum against MoMuLV p30, which detects the Gag protein and one of its cleavage product, the capsid protein (p30). Infection was done in the presence of polybrene (Sigma) at 8 μ g/ml. Cells were passaged every third day and culture medium was harvested every day during 15 days as described above in the analysis of viral replication and propagation section. The amount of viruses produced was detected by dot blotting with MoMuLV p30 and the reverse transcriptase activity of these virions was also measured to assess the relative Gag-Pol/Gag ratio associated to the virions.

Reverse transcriptase activity assays

The standard reverse transcriptase activity assay was adapted from Smith et al. (1990). An aliquot of the harvest (35 μ l) was mixed with a cocktail reaction in a final volume of 100 μ l (final concentration: 10 μ M dTTP, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mg/mL bovine serum albumin, 0.05% Nonidet P-40, 20 μ g/ml poly (rA) \cdot dT₁₂₋₁₈ (Roche) and 4 μ Ci [³H]dTTP (Perkin-Elmer, 88 Ci/mmol)). The reaction was incubated for one hour at 37°C, followed by the addition of fresh MnCl₂ at a final concentration of 2 mM for 15 minutes. Precipitates were formed by adding trichloroacetic acid (12.5% w/v), sodium pyrophosphate (50 mM) and baker's yeast tRNA (0.5 mg) in a final volume of 1 ml. The mixture was kept on ice for two hours and filtered through glass microfibre filters 934-AH (Whatman). The radioactivity was counted in a Liquid Scintillation Counter Rackbeta1217 (Perkin Elmer).

Analysis of viral RNA by RT-PCR

Viral RNA was extracted from viral suspensions with Trizol LS reagent (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. The first-strand cDNA synthesis was made using MoMuLV reverse transcriptase according to a standard protocol (Invitrogen) with a primer named oligo B (5'-AGGAGGTCCCAACT-CGATCGCGACC-3') which is complementary to a gag sequence upstream the readthrough region of MoMuLV. The PCR reactions were made with primers that are complementary to *gag* or *pol* sequences flanking the HIV-1 insertion. Ten % of the first-strand reaction was used for the first PCR amplification reaction performed with oligo A (5'-CCCATAACCTGAGCT-CCTGATCCCTC-3') and oligo B. One tenth of this PCR reaction was used for the second PCR reaction that was performed using oligo B and an internally located primer called oligo C (5'-GGTCCAGCGATACCGC-TTTCCTCC-3'). This second PCR reaction was sequenced by automated DNA sequencing using oligo C as a primer.

Analysis of the viral proteins by dot blot and Western Blot

Virions were harvested from infected cells, resuspended in Tris-EDTA and lysed in a 2x RIPA buffer (final concentration: 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , pH 7.2, 140 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% sodium dodecyl sulfate) containing a cocktail of protease inhibitors. Cell debris was removed by a 10 minute-centrifugation at 3000 rpm in an AllegraTM Centrifuge (Beckman Coulter). Samples were either analysed by a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Western blot) or directly spotted on a nitrocellulose film (dot blot). Samples were then immunoblotted, using a goat anti-p30 antiserum diluted 1/3000 (National Cancer Institute) and a horseradish peroxidase-conjugated swine anti-goat secondary antibody (Cedarlane). Antigen-antibody complexes were detected by enhanced chemiluminescence and autoradiography. Dots and bands from lightly exposed film (Biomax, MR) were scanned and quantified with Quantity One (Bio-Rad), using serial dilutions.

Single-round infectivity assays

These assays were performed as described in Wang and Goff (2003). 293FT cells were transiently co-transfected with 8 μg proviral DNA (pGMO, pGMofs-long, pGMofs-short or pGMofs-B*), 2 μg of a murine retrovirus vector (SR α Luc) carrying a reporter gene coding for the firefly luciferase (An et al. 1999) and 1 μg of pcDNA3.1/Hygro(+)/lacZ. The culture media were collected 48 hours post-transfection. The β -galactosidase activity of the cell lysates was measured to normalize for variations in transfection efficiency as described above in the luciferase assays section. Equivalent volumes (1 ml or 3 ml) of culture medium containing either the wild-type or the mutant reporter virus were used to infect NIH 3T3 cells during one hour in presence of polybrene at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cells were trypsinized 36 hours post-infection, pelleted and washed with PBS, lysed with 200 μl of the Culture Cell Lysis Reagent (Promega) and the infectivity of the viruses was assayed by measuring the luciferase activity in lysates (5 μl) of the infected cells as described above.

Luciferase assays in cultured cells

293FT cells (Invitrogen) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum. About 2×10^6 cells were seeded in 6-well plates the day prior to transiently transfecting, with a standard calcium phosphate precipitation, 2 μ g of the different pLUC vectors and 1 μ g of pcDNA3.1/Hygro(+)/lacZ (Invitrogen), as an internal reporter to normalize the transfection efficiency. Cells were harvested 48 hours post-transfection and lysed with 600 μ l of the Cell Culture Lysis Reagent (Promega). The luciferase activity, measured in 2 μ l of this cell lysate, was determined with a standard luciferase assay (Dyer et al. 2000) or with a Luciferase Assay Reagent (Promega) for the single-round infectivity assays and measured in relative light units in a Berthold Lumat LB 9507 luminometer. The β -galactosidase activity of the cell lysates was measured with the chlorophenol-red- β -D-galactopyranoside substrate (Calbiochem), using a standard procedure (Eustice et al. 1991).

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to L. B.-G. and G.L. and a group grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to L. B.-G. and G.L. K.G. acknowledges a studentship from the FRSQ. We are grateful to Dr. Irvin S.Y. Chen for the gift of SR α Luc and Dr. Alan Rein for providing us with MoMuLV anti-p30 antiserum. We thank Martin Baril, Luc DesGroseillers and Nikolaus Heveker for stimulating discussions and for critical reading of this manuscript.

References:

- Alam, S. L., Wills, N. M., Ingram, J. A., Atkins, J. F., and Gesteland, R. F. (1999). Structural studies of the RNA pseudoknot required for readthrough of the gag-termination codon of murine leukemia virus. *J Mol Biol* 288(5), 837-52.
- An, D. S., Morizono, K., Li, Q. X., Mao, S. H., Lu, S., and Chen, I. S. (1999). An inducible human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vector which effectively suppresses HIV-1 replication. *J Virol* 73(9), 7671-7.
- Baril, M., Dulude, D., Gendron, K., Lemay, G., and Brakier-Gingras, L. (2003). Efficiency of a programmed -1 ribosomal frameshift in the different subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 group M. *Rna* 9(10), 1246-53.
- Berkhout, B. (2004). RNA interference as an antiviral approach: targeting HIV-1. *Curr Opin Mol Ther* 6(2), 141-5.
- Biswas, P., Jiang, X., Pacchia, A. L., Dougherty, J. P., and Peltz, S. W. (2004). The human immunodeficiency virus type 1 ribosomal frameshifting site is an invariant sequence determinant and an important target for antiviral therapy. *J Virol* 78(4), 2082-7.
- Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* 77(21), 11531-5.
- Brierley, I. (1995). Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol* 76 (Pt 8), 1885-92.
- Brierley, I., and Pennell, S. (2001). Structure and function of the stimulatory RNAs involved in programmed eukaryotic-1 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 233-48.
- Brunelle, M. N., Brakier-Gingras, L., and Lemay, G. (2003). Replacement of murine leukemia virus readthrough mechanism by human immunodeficiency virus frameshift allows synthesis of viral proteins and virus replication. *J Virol* 77(5), 3345-50.
- Chantry, D. (2004). HIV entry and fusion inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs* 9(1), 1-7.

- Chen, B. K., Rousso, I., Shim, S., and Kim, P. S. (2001). Efficient assembly of an HIV-1/MLV Gag-chimeric virus in murine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26), 15239-44.
- Chen, C., and Montelaro, R. C. (2003). Characterization of RNA elements that regulate gag-pol ribosomal frameshifting in equine infectious anemia virus. *J Virol* 77(19), 10280-7.
- Clapham, P. R., and McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* 83(Pt 8), 1809-29.
- Coakley, E. P., Gillis, J. M., and Hammer, S. M. (2000). Phenotypic and genotypic resistance patterns of HIV-1 isolates derived from individuals treated with didanosine and stavudine. *Aids* 14(2), F9-15.
- Dulude, D., Baril, M., and Brakier-Gingras, L. (2002). Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 30(23), 5094-102.
- Dyer, B. W., Ferrer, F. A., Klinedinst, D. K., and Rodriguez, R. (2000). A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem* 282(1), 158-61.
- Eustice, D. C., Feldman, P. A., Colberg-Poley, A. M., Buckery, R. M., and Neubauer, R. H. (1991). A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. *Biotechniques* 11(6), 739-40, 742-3.
- Evans, M. J., Bacharach, E., and Goff, S. P. (2004). RNA sequences in the Moloney murine leukemia virus genome bound by the Gag precursor protein in the yeast three-hybrid system. *J Virol* 78(14), 7677-84.
- Felsenstein, K. M., and Goff, S. P. (1988). Expression of the gag-pol fusion protein of Moloney murine leukemia virus without gag protein does not induce virion formation or proteolytic processing. *J Virol* 62(6), 2179-82.

- Felsenstein, K. M., and Goff, S. P. (1992). Mutational analysis of the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus: requirements for expression of the gag-pol fusion protein. *J Virol* 66(11), 6601-8.
- Feng, Y. X., Campbell, S., Harvin, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Rein, A. (1999). The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J Virol* 73(5), 4251-6.
- Feng, Y. X., Yuan, H., Rein, A., and Levin, J. G. (1992). Bipartite signal for read-through suppression in murine leukemia virus mRNA: an eight-nucleotide purine-rich sequence immediately downstream of the gag termination codon followed by an RNA pseudoknot. *J Virol* 66(8), 5127-32.
- Fu, W., Ortiz-Conde, B. A., Gorelick, R. J., Hughes, S. H., and Rein, A. (1997). Placement of tRNA primer on the primer-binding site requires pol gene expression in avian but not murine retroviruses. *J Virol* 71(9), 6940-6.
- Gardner, M. B. (1978). Type C viruses of wild mice: characterization and natural history of amphotropic, ecotropic, and xenotropic MuLv. *Curr Top Microbiol Immunol* 79, 215-59.
- Grentzmann, G., Ingram, J.A., Kelly, P.J., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 1998. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *Rna* 4: 479-486.
- Goff, S. P. (1984). The genetics of murine leukemia viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 112, 45-71.
- Goff, S. P. (2004). Genetic reprogramming by retroviruses: enhanced suppression of translational termination. *Cell Cycle* 3(2), 123-5.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1), 51-9.

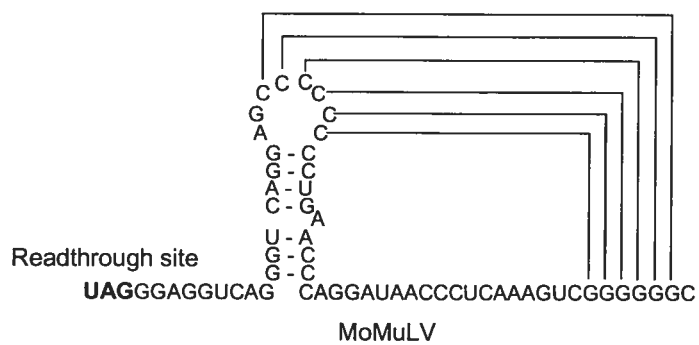
- Hung, M., Patel, P., Davis, S., and Green, S. R. (1998). Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. *J Virol* 72(6), 4819-24.
- Isel, C., Ehresmann, C., Walter, P., Ehresmann, B., and Marquet, R. (2001). The emergence of different resistance mechanisms toward nucleoside inhibitors is explained by the properties of the wild type HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 276(52), 48725-32.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., and Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331(6153), 280-3.
- Jones, D. S., Nemoto, F., Kuchino, Y., Masuda, M., Yoshikura, H., and Nishimura, S. (1989). The effect of specific mutations at and around the gag-pol gene junction of Moloney murine leukaemia virus. *Nucleic Acids Res* 17(15), 5933-45.
- Kang, H. (1998). Direct structural evidence for formation of a stem-loop structure involved in ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1. *Biochim Biophys Acta* 1397(1), 73-8.
- Karacostas, V., Wolffe, E. J., Nagashima, K., Gonda, M. A., and Moss, B. (1993). Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* 193(2), 661-71.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A., and Gottlinger, H. G. (1995). The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J Virol* 69(5), 2759-64.
- LaBonte, J., Lebbos, J., and Kirkpatrick, P. (2003). Enfuvirtide. *Nat Rev Drug Discov* 2(5), 345-6.
- Lee, N. S., and Rossi, J. J. (2004). Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res* 102(1), 53-8.

- Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R., and Bolognesi, D. (2004). Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* 3(3), 215-25.
- Miller, M. D., and Hazuda, D. J. (2004). HIV resistance to the fusion inhibitor enfuvirtide: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist Updat* 7(2), 89-95.
- Orlova, M., Yueh, A., Leung, J., and Goff, S. P. (2003). Reverse transcriptase of Moloney murine leukemia virus binds to eukaryotic release factor 1 to modulate suppression of translational termination. *Cell* 115(3), 319-31.
- Park, J., and Morrow, C. D. (1992). The nonmyristylated Pr160gag-pol polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 interacts with Pr55gag and is incorporated into viruslike particles. *J Virol* 66(11), 6304-13.
- Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E. A., King, N. M., and Schiffer, C. A. (2003). Viability of a drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease variant: structural insights for better antiviral therapy. *J Virol* 77(2), 1306-15.
- Reed, M., Mariani, R., Sheppard, L., Pekrun, K., Landau, N. R., and Soong, N. W. (2002). Chimeric human immunodeficiency virus type 1 containing murine leukemia virus matrix assembles in murine cells. *J Virol* 76(1), 436-43.
- Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M., and Mak, J. (2001). Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* 75(4), 1834-41.
- Shehu-Xhilaga, M., Hill, M., Marshall, J. A., Kappes, J., Crowe, S. M., and Mak, J. (2002). The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *J Virol* 76(9), 4331-40.
- Shinnick, T. M., Lerner, R. A., and Sutcliffe, J. G. (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* 293(5833), 543-8.
- Smith, A. J., Cho, M. I., Hammariskjold, M. L., and Rekosh, D. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 Pr55gag and Pr160gag-pol expressed from a simian

- virus 40 late replacement vector are efficiently processed and assembled into viruslike particles. *J. Virol.* 64, 2743-50.
- Telenti, A., Martinez, R., Munoz, M., Bleiber, G., Greub, G., Sanglard, D., and Peters, S. (2002). Analysis of natural variants of the human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshift stem-loop structure. *J Virol* 76(15), 7868-73.
- Tsichlis, P. N. (1987). Oncogenesis by Moloney murine leukemia virus. *Anticancer Res* 7(2), 171-80.
- Wang, M. Q., and Goff, S. P. (2003). Defects in virion production caused by mutations affecting the C-terminal portion of the Moloney murine leukemia virus capsid protein. *J Virol* 77(5), 3339-44.
- Wills, N. M., Gesteland, R. F., and Atkins, J. F. (1991). Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16), 6991-5.
- Wills, N. M., Gesteland, R. F., and Atkins, J. F. (1994). Pseudoknot-dependent read-through of retroviral gag termination codons: importance of sequences in the spacer and loop 2. *Embo J* 13(17), 4137-44.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T. D., and Oroszlan, S. (1985). Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(6), 1618-22.
- Yuan, B., Campbell, S., Bacharach, E., Rein, A., and Goff, S. P. (2000). Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J Virol* 74(16), 7250-60.

Figure 2-1. Structure of the HIV-1 frameshift region inserted in the genome of Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) at the *gag-pol* junction (A) Readthrough region of MoMuLV containing the site of readthrough in bold and the stimulatory pseudoknot. (B) Frameshift region of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing the classic (HIV-1 short), the complete (HIV-1 long), or a mutated (HIV-1 B*) frameshift stimulatory signal with a three-nucleotide deletion. Circles in the mutated signal indicate the bases that differ from the complete stimulatory signal (group M subtype B). The slippery site is in bold. Stop codons that were introduced in the (0) frame to terminate the synthesis of the Gag precursor are underlined. Note that for HIV-1 B* the stop codon does not directly follow the frameshift signal but is located at the junction of the frameshift region and the inactivated readthrough region, at a cleavage site for the MoMuLV protease (see details in Materials and Methods).

A



B

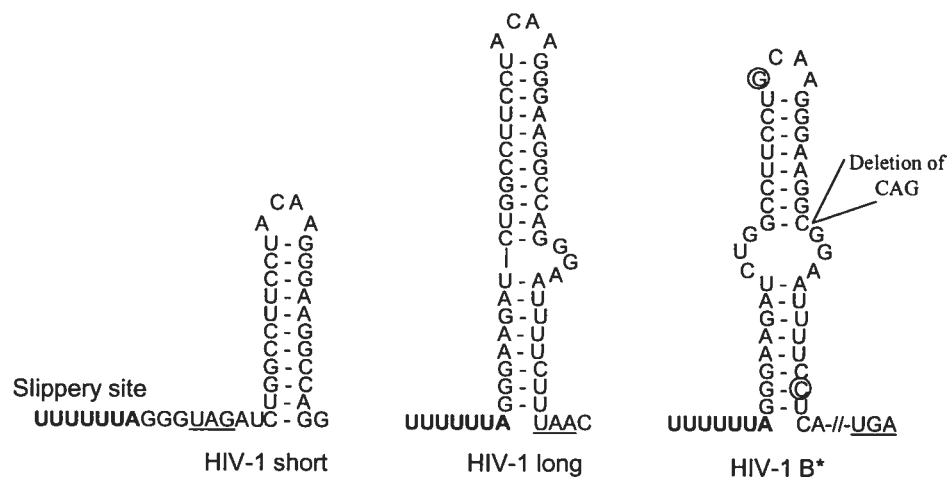


Figure 2-2. Details on the sequence of the *gag-pol* junction in the proviral DNA of wild-type and chimeric MoMuLV. Plasmid pGMo contains the wild-type MoMuLV DNA. In the enlarged *gag-pol* junction, the ▲ indicates a cleavage site for MoMuLV protease, the readthrough site, in bold, is followed by the stimulatory pseudoknot. Plasmid pGMofs-long contains the chimeric proviral DNA, with the complete frameshift region of HIV-1. The insertion is bracketed between two cleavage sites. The (*ss*) represents the slippery site which is followed by the complete stimulatory signal and by the readthrough region, where the original site of readthrough is replaced with CAG (in bold). The same type of chimera was obtained with the classic frameshift stimulatory signal (pGMofs-short) and the mutated stimulatory signal (pGMofs-B*).

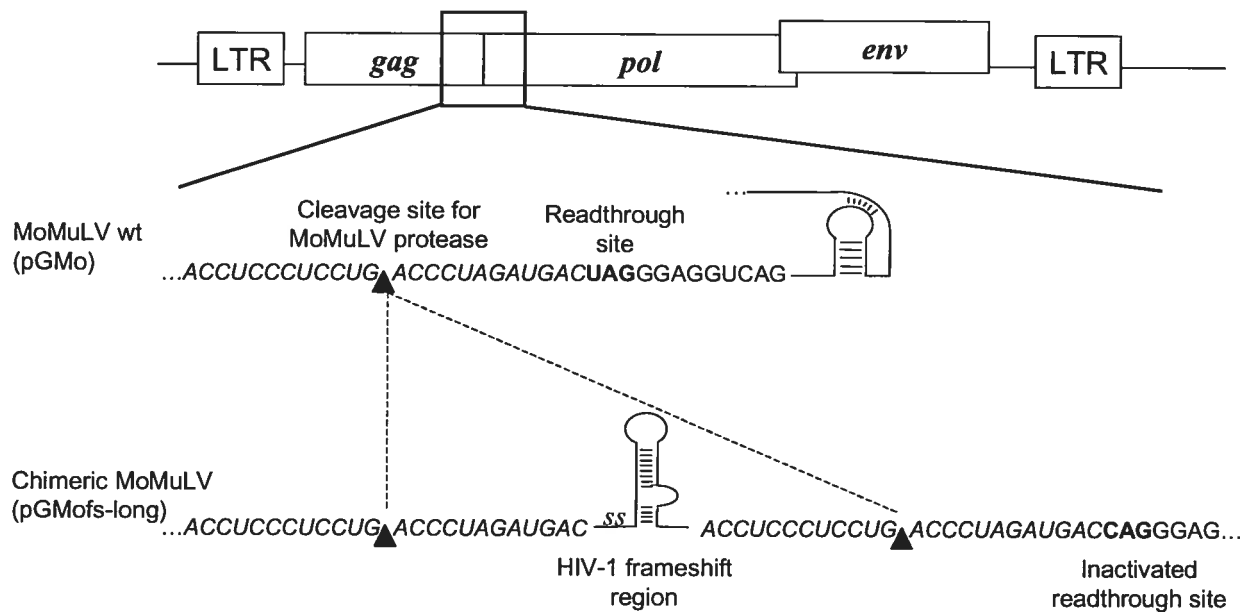
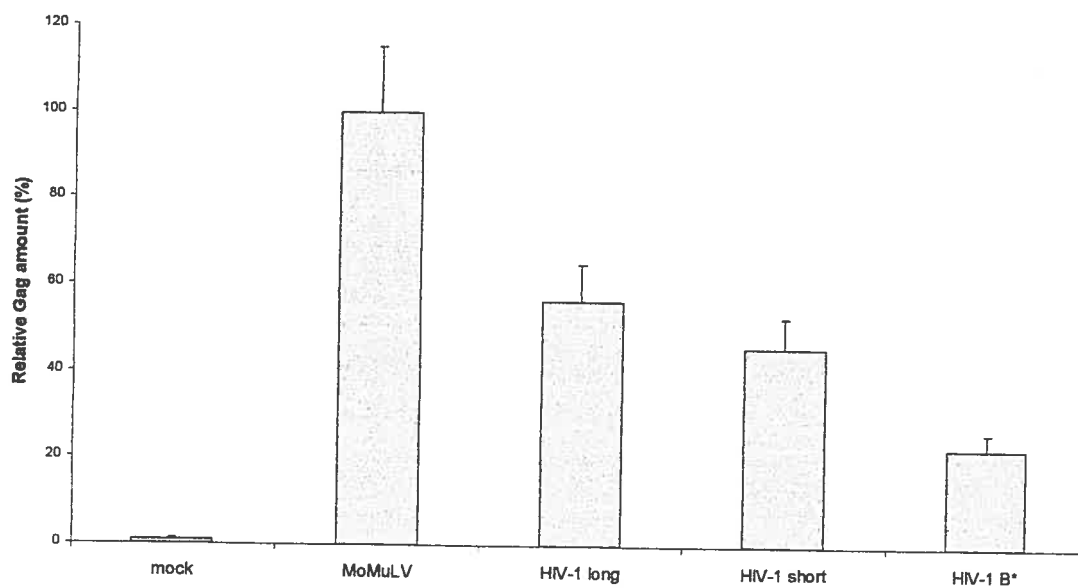


Figure 2-3. Analysis of the infectivity of the chimeric viruses by replication and single-round infection assays. (A) Replication assays. Gag dot blotting was used to monitor the amount of virions produced in the supernatant following the infection of NIH 3T3 cells with either wild-type or chimeric virions obtained from cells chronically infected with pGMofs-long (HIV long), pGMofs-short (HIV short) or pGMofs-B* (HIV B*). Supernatants were harvested post-infection every third day and treated as described in Materials and Methods to quantify the amount of Gag released from the infected cells. The figure is representative of three independent experiments and shows the amount of viruses obtained after nine days. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the mean amount of Gag released from wild-type MoMuLV virions. Standard errors on the means are shown as error bars. (B) Single-round infectivity assays. 293FT cells were co-transfected with pGMO (MoMuLV), pGMofs-long (HIV-1 long), pGMofs-short (HIV-1 short) or pGMofs-B* (HIV-1 B*), plus a murine retrovirus vector (SR α Lluc) coding for the firefly luciferase and pcDNA3.1/Hygro(+)/lacZ, coding for β -galactosidase, as described in Materials and Methods. The infectivity of the viruses was assayed by measuring 36 hours post-infection the luciferase activity of lysates of NIH 3T3 cells infected with equal amounts of luciferase reporter virus packaged by mutant viruses serving as helpers. The figure presents the means of four independent experiments. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the mean luciferase activity with wild-type MoMuLV virions. Standard errors on the means are shown as error bars.

A



B

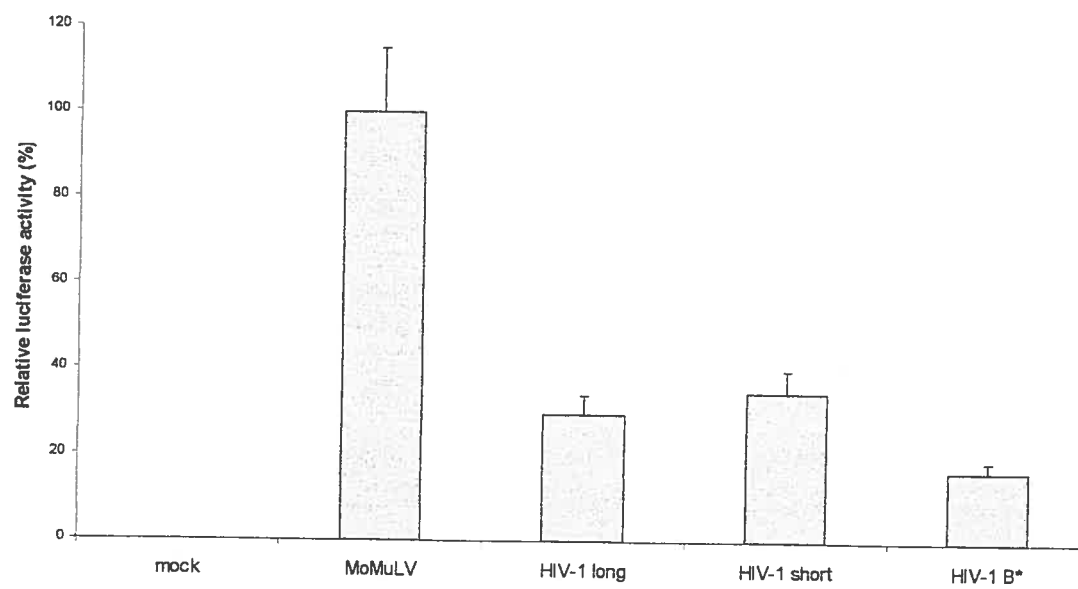
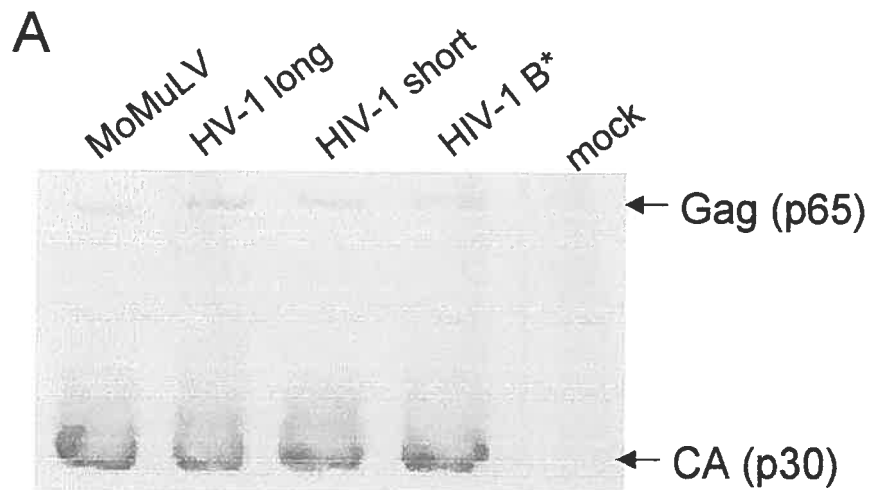


Figure 2-4. Analysis of the processing of the Gag polypeptide by Western Blot and assessment of the Gag-Pol/Gag ratio in the chimeric virions. (A) Total amount of Gag (Gag + p30 bands) in the virions, as revealed by immunoblotting. The viral proteins were fractionated by SDS-PAGE and Gag and p30 were revealed with an anti-p30 (CA) antiserum. Equal total amounts of Gag were used in these assays. The Gag/CA ratio was about 10% for the wild-type virus and for the chimeras. These results is a representative example of four independent experiments. (B) Reverse transcriptase activity associated to the virions. The reverse transcriptase activity reflects the amount of Gag-Pol and of one of its cleavage products, the reverse transcriptase, incorporated into the virions. The Gag-Pol to Gag ratio was calculated from the reverse transcriptase activities and the amount of Gag determined as in Fig.3. A value of 100% was arbitrarily ascribed to the Gag-Pol to Gag ratio of the wild-type MoMuLV. Results are the means of three independent experiments and correspond to virions released after nine days. The standard error on the means was inferior or equal to 15%.



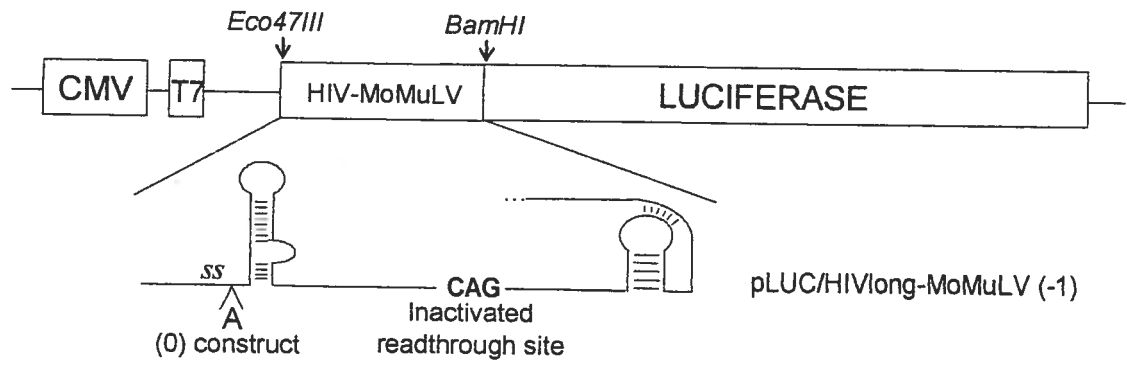
B

	MoMuLV	HIV-long	HIV-1 short	HIV-1 B*	mock
RT activity (cpm)	90696	39241	30941	26139	1138
Relative Gag-Pol/Gag ratio	100%	51%	44%	30%	

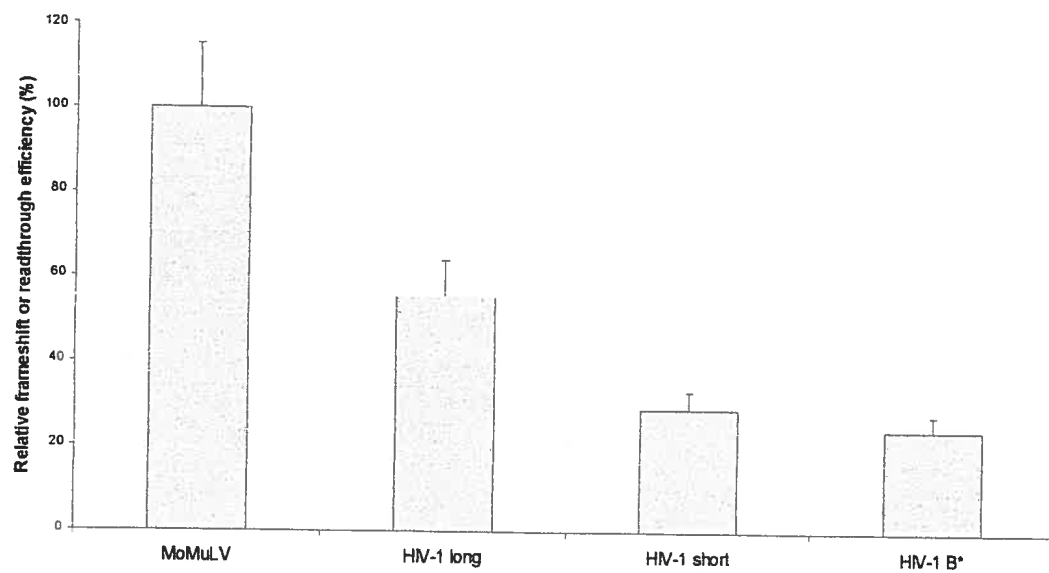
Figure 2-5: Comparison of the frameshift efficiency of HIV-1 to the readthrough efficiency of MoMuLV. (A) Example of a vector expressing a luciferase reporter used to compare HIV-1 frameshift efficiency to MoMuLV readthrough efficiency in cultured cells. The HIV-1 frameshift region (short, long or B*), followed by the inactivated readthrough region of MoMuLV, is inserted at the beginning of the luciferase coding sequence, between the *Eco47III* and *BamHI* sites. This generated the (-1) constructs, in which the *luc* sequence is in a -1 reading frame relative to the initiator codon so that a -1 frameshift is required to synthesize luciferase. For each (-1) construct, a corresponding in-frame (0) construct was made by inserting an adenine immediately downstream the slippery site so that the luciferase is produced by conventional translation. The figure presents pLUC/HIVlong-MoMuLV (-1) with the slippery site (*ss*), the complete stimulatory signal and the inactivated readthrough region of MoMuLV so as to reproduce the context of the frameshift region in the chimeric virus. When the readthrough efficiency is measured, the readthrough region of MoMuLV is inserted between the *Eco47III* and *BamHI* sites such that the luciferase production is dependent on a readthrough event, generating pLUC/MoMuLV (readthrough) (not shown). (B) Relative frameshift efficiency monitored by the luciferase activity in lysates from 293FT cells transfected with the vectors containing the HIV-1 classic, complete and mutated frameshift regions, compared to the readthrough efficiency of MoMuLV. The readthrough efficiency of MoMuLV is arbitrarily set at 100%, its experimental value being $5.2\% \pm 0.5\%$. The luciferase activity of the cell lysates was

measured as described in Materials and Methods. Results are the means of at least four independent experiments. The standard error on the means was inferior or equal to 10%.

A



B



Chapitre III

Discussion

5.1 Rappel de la problématique

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est le rétrovirus qui cause le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Il a tué plus de 20 millions de personnes depuis son apparition et plus de 40 millions de personnes sont infectées par ce virus actuellement. La trithérapie utilisée pour combattre le VIH-1 est basée sur des inhibiteurs d'enzymes virales, soit la transcriptase inverse et la protéase. Récemment, des inhibiteurs de fusion ont été développés et sont utilisés pour traiter des patients. Cependant, il y a apparition de souches virales résistantes à tous ces inhibiteurs. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles cibles pour développer de nouveaux agents anti-VIH.

Comme tous les rétrovirus, le VIH-1 doit contrôler le niveau d'expression de ses enzymes par rapport à ses protéines de structure. Pour ce faire, il utilise un mécanisme non-conventionnel durant la traduction de l'ARN de pleine longueur, soit un changement programmé du cadre de lecture d'une base en direction 5' (*frameshift* programmé -1). Les gènes *gag* et *pol*, codant respectivement pour les protéines de structure et les enzymes virales, sont tous deux exprimés à partir de l'ARN de pleine longueur du virus et sont superposés sur une courte région. Le gène *pol* se trouve dans le cadre de lecture -1 par rapport à *gag* et ne possède pas de codon initiateur au début de sa séquence codante. La majorité des ribosomes qui débutent la traduction au codon initiateur de *gag* traduisent le messenger de façon conventionnelle et produisent le précurseur polyprotéique Gag. Cependant, une minorité de ces ribosomes, environ 5%, changent de cadre de lecture lorsqu'ils atteignent une séquence particulière d'ARN située avant le codon de terminaison de *gag*. Ils se retrouvent alors dans le cadre de lecture -1, ce qui leur permet d'exprimer le gène *pol* et de produire le précurseur polyprotéique Gag-Pol. Le *frameshift* se produit dans une région dite région de *frameshift* du VIH-1, qui est composée d'une séquence glissante, où se produit le changement du cadre de lecture proprement dit, suivie d'un signal stimulateur, une structure secondaire d'ARN. On a longtemps pensé que le signal

stimulateur de *frameshift* du VIH-1 était une simple tige-boucle, que nous nommons signal classique. Cependant, Dulude et al. (2002) ont montré que ce signal stimulateur est plus complexe et consiste en une tige-boucle allongée où une excroissance (*bulge*) de trois purines sépare la portion supérieure de la portion inférieure. Nous nommons ce nouveau signal le signal complet. Le signal stimulateur classique correspond à la portion supérieure du signal stimulateur complet. Le *frameshift* programmé -1 du VIH-1 permet de contrôler le rapport Gag-Pol/Gag d'environ 5% qui est crucial pour la réplication et l'infectivité virale. Le *frameshift* est donc une excellente cible pour développer des agents anti-VIH puisqu'une variation de l'efficacité de *frameshift* perturbe le rapport Gag-Pol/Gag et, par conséquent, l'infectivité virale.

Le but de mon projet de recherche était de développer un outil pour étudier *in vivo* les effets d'agents dirigés contre le *frameshift* du VIH-1. L'effet de nouveaux agents est d'abord étudié dans des cellules où l'on cultive le virus, mais il est évidemment indispensable de passer ensuite à des études *in vivo*. Cependant, à ce jour, il n'existe aucun modèle animal pratique et peu coûteux susceptible au VIH. La souris constitue un modèle animal intéressant puisque c'est un mammifère bien caractérisé, fréquemment utilisé en laboratoire. Nous avons décidé de créer un virus chimérique dérivé du virus de la leucémie murine (MuLV), capable d'infecter des souris, mais contenant une portion du génome du VIH. Une telle chimère permettrait d'étudier *in vivo* l'effet d'agents dirigés contre le *frameshift* du VIH-1. MuLV est un rétrovirus de souris, plus simple que le VIH-1, dont le génome ne comporte que trois gènes soit *gag*, *pol* et *env*. Comme le VIH-1, MuLV contrôle la production de ses enzymes par rapport aux protéines de structure, mais il utilise la suppression programmée d'un codon de terminaison (*readthrough* programmé) plutôt qu'un *frameshift* -1. Les gènes *gag* et *pol*, exprimés à partir de l'ARN de pleine longueur du virus, se trouvent dans le même cadre de lecture, uniquement séparés par le codon de terminaison de Gag. La majorité des ribosomes qui débutent la traduction au codon initiateur de *gag* traduisent l'ARN de façon conventionnelle et produisent le précurseur Gag en arrêtant la traduction au codon de terminaison de Gag. Cependant, une minorité de ces

ribosomes, soit environ 5%, décodent le codon de terminaison de *gag* comme un codon glutamine et traduisent alors la séquence de *pol* jusqu'à ce qu'ils rencontrent un codon de terminaison. Le *readthrough* permet ainsi la production du précurseur Gag-Pol. Notre stratégie a été de construire un MuLV chimérique dans lequel la production de Gag-Pol ne dépend plus d'un *readthrough*, mais plutôt d'un *frameshift* -1 contrôlé par la région de *frameshift* du VIH-1. Le sous-type B du groupe M du VIH-1 étant une forme très répandue et majoritairement étudiée, nous avons utilisé la région de *frameshift* de ce sous-type pour notre étude. Si la chimère est infectieuse chez les souris, elle sera très utile pour tester *in vivo* des agents dirigés contre le *frameshift* du VIH-1. Notre équipe avait déjà montré qu'il était possible de créer un MuLV chimérique dont la production de Gag-Pol dépend de la région classique de *frameshift* du VIH-1. Pour construire cette chimère dite chimère courte, la région classique de *frameshift* du VIH-1 a été insérée à la jonction des gènes *gag* et *pol* dans le génome de MuLV et le *readthrough* a été inactivé par le remplacement du codon de terminaison de Gag par un codon glutamine. Il a aussi été montré que ces virions chimériques peuvent se propager dans des cellules en culture suite à la transfection de fibroblastes de souris. Cependant, l'essai de propagation virale est un essai qualitatif effectué avec des grandes quantités d'ADN proviral qui indique si la chimère peut se répliquer ou non dans des cellules en culture, mais cet essai ne détecte pas de faibles variations d'infectivité. L'essai d'infectivité, par contre, peut détecter des défauts éventuels de réplication des chimères qui n'ont pas d'effet dans les conditions expérimentales de propagation dans des cellules en culture, mais qui pourraient ralentir la réplication et la propagation des chimères *in vivo*.

Pour utiliser une chimère de MuLV dans des souris dans le but d'étudier l'effet d'agents anti-VIH dirigés contre le *frameshift*, il est préférable que cette chimère contienne le signal stimulateur complet de *frameshift* du VIH-1. Il est donc nécessaire de construire une chimère, semblable à la chimère courte, mais contenant cette fois la région complète de *frameshift* du VIH-1. Nous avons émis l'hypothèse qu'une telle chimère, que nous appelons chimère longue, devrait être infectieuse puisque, d'après la littérature, l'efficacité de

frameshift de la région complète du VIH-1 est similaire à l'efficacité de *readthrough* de MuLV (Dulude et al. 2002; Baril et al. 2003; Orlova et al. 2003). Par contre, l'efficacité de *frameshift* de la région classique du VIH-1 est plus faible que celle de la région de *readthrough* de MuLV, ce qui pourrait affecter l'infectivité de la chimère courte. Nous avons aussi construit, à titre de comparaison, une troisième chimère, la chimère B*, en remplaçant la région de *frameshift* complète du sous-type B du VIH-1 par la région de *frameshift* du sous-type B*, un variant naturel du VIH-1. Le signal stimulateur du sous-type B* est muté et produit une efficacité de *frameshift* similaire à celle de la région classique de *frameshift*. Après avoir obtenu les trois chimères soit la chimère courte, la chimère longue et la chimère B*, nous avons procédé à leur caractérisation. Nous avons étudié la propagation et l'infectivité des chimères par rapport au MuLV sauvage, analysé la maturation des protéines virales de ces chimères et comparé le rapport Gag-Pol/Gag de chacune des chimères à celui du virus sauvage. Nous avons aussi vérifié que les insertions des régions de *frameshift* du VIH-1 étaient stables et n'étaient pas mutées, même après plusieurs cycles de réplication dans des cellules en culture. En parallèle, nous avons mesuré l'efficacité de *frameshift* produite par chacune des trois régions étudiées et l'efficacité de *readthrough* du MuLV sauvage dans un même système d'étude utilisant la luciférase comme gène rapporteur. Les efficacités de *frameshift* du VIH-1 avaient en effet été évaluées dans un système différent de celui utilisé pour mesurer l'efficacité de *readthrough* de MuLV, ce qui peut fausser toute comparaison. Or, cette comparaison s'avère importante puisque c'est l'efficacité du recoding qui est responsable du maintien du rapport Gag-Pol/Gag nécessaire pour l'infectivité virale.

5.2 Étude de l'infectivité des MuLV chimériques

Les essais de propagation virale montrent que les trois chimères dérivées de MuLV peuvent se répliquer dans des cellules en culture. Ces essais consistent à transfecter des

fibroblastes de souris (NIH 3T3) avec l'ADN proviral d'une des trois chimères ou du virus sauvage et à mesurer la production virale pendant plusieurs jours. Nous observons une production efficace des chimères et du virus sauvage après environ deux semaines. Il est à noter que la production du virus sauvage est détectée plus tôt que celle des chimères. Pour cette étude qualitative, l'essai utilisé pour détecter la production virale était la mesure de l'activité RT (transcriptase inverse) contenue dans le surnageant. Nous avons ensuite examiné l'infectivité des chimères par rapport au virus sauvage. Pour ce faire, nous avons récolté les virions produits à partir de cellules NIH 3T3 chroniquement infectées obtenues après les avoir transfecté avec chaque type de provirus chimériques ou sauvage. Nous avons évalué la quantité de virus récoltés en mesurant la quantité de Gag produite par la méthode de *dot blot*. Cette méthode consiste à déposer un aliquot de suspension virale sur une membrane de nitrocellulose et à effectuer un marquage avec un anticorps. Dans ce cas-ci, l'anticorps utilisé était un anticorps de chèvre anti-capside (CA), la protéine de la capsid étant une protéine libérée lors de la maturation de Gag. Un deuxième marquage est ensuite fait avec un anticorps anti-chèvre lié à la peroxidase de raifort pour révéler l'anticorps anti-CA par chemiluminescence. Cette quantification des virions par *dot blot* nous assure que nous utilisons au départ des quantités identiques de virions. Habituellement, lors des tests d'infection, la quantité de virions produits est évaluée par une mesure de l'activité RT dans la suspension virale. Cependant, dans notre cas, cette méthode pourrait être inappropriée puisque nous remplaçons la région de *readthrough* de MuLV par différentes régions de *frameshift* du VIH-1. La quantité de Gag-Pol et donc de RT produit pourrait ne pas être la même pour les quatre virus étudiés, comme nous en discuterons plus loin. Donc, nous avons utilisé la quantification de Gag pour évaluer la quantité de virions produits après infection et, en parallèle, nous avons mesuré la quantité de Gag-Pol par un test d'activité RT. Suite à la quantification des virions, nous avons procédé à l'infection de cellules en culture NIH 3T3 durant huit heures en présence de polybrène avec une quantité équivalente de virions pour chaque type de virus étudié. Cette quantité de virus correspond à une activité RT de 25 000 cpm pour le virus sauvage dans nos conditions expérimentales

de mesure de l'activité RT, ce qui indique une faible quantité de virus. Dans les chimères, pour une même quantité de Gag, l'activité RT était plus petite que celle du virus sauvage, confirmant que la quantification des virions d'après l'activité RT n'est pas appropriée pour notre étude. Les milieux de culture des cellules NIH 3T3 infectées étaient récoltés sur plusieurs jours pour mesurer la quantité de Gag produite, quantité qui reflète la production virale. Ces essais d'infectivité montrent que les chimères longues et courtes sont environ deux fois moins infectieuses que le virus sauvage tandis que la chimère B* est trois fois moins infectieuse. Pour confirmer cette observation, nous avons utilisé une deuxième approche indépendante pour évaluer l'infectivité des virions soit l'essai du *single-round infection*. Cette technique est plus précise puisqu'elle mesure l'efficacité du premier cycle d'infection tandis que plusieurs paramètres peuvent introduire des variations lors de la première approche utilisée, entre autres les nombreux passages cellulaires, des différences dans le nombre de cellules dans chaque pétri, la longueur de la période de temps sur laquelle s'étend cet essai et le fait que les virus sont congelés avant d'être utilisés pour infecter les fibroblastes. L'essai du *single-round infection* consiste à co-transfecter des cellules HEK 293T avec chaque ADN proviral et un vecteur contenant le gène de la luciférase de la luciole, qui est sous le contrôle du *long terminal repeat* (LTR) de MuLV. L'ARN codant pour la luciférase est alors encapsidé dans les virions formés, qui sont récoltés 48 heures après la transfection et utilisés pour infecter des cellules NIH 3T3 en culture durant une heure en présence de polybrène. Dans cet essai, les MuLV chimériques ou sauvage produits servent de virus *helper* à l'ARN codant pour la luciférase. L'activité luciférase du lysat cellulaire est mesurée 72 heures après l'infection et est directement proportionnelle à l'infectivité de chaque ADN proviral transfecté, puisque seules les cellules ayant été infectées par ces virions produisent l'enzyme. L'essai du *single-round infection* montre que les chimères longues et courtes sont trois fois moins infectieuses que le virus sauvage et que la chimère B* est cinq fois moins infectieuse. Cette méthode permet de détecter de faibles différences dans l'infectivité des virus puisque le temps d'infection

est très court et que les essais luciférase utilisés pour mesurer l'infectivité des virions sont très sensibles.

5.3 Étude de la relation entre la synthèse de Gag-Pol de chacune des chimères et la diminution d'infectivité observée

Les deux essais d'infectivité montrent que, même si les virus chimériques peuvent se répliquer dans des cellules en culture, ils sont moins infectieux que le virus sauvage. Des problèmes entraînés par la présence de l'insertion de la région du *frameshift* du VIH-1 elle-même ou par des mutations non-désirée dans cette région pourraient être responsables de cette diminution d'infectivité. Nous avons donc examiné si la présence de l'insertion dans les trois chimères affecte la maturation de Gag. Pour ce faire, nous avons effectué un *Western blot* à partir des suspensions virales utilisées pour effectuer les essais d'infectivité. Nous avons utilisé le même anticorps anti-CA que pour les *dot blot*, puisqu'il reconnaît à la fois le précurseur Gag non-maturé et la protéine de la capsid (CA) clivée du précurseur. À partir d'échantillons contenant une même quantité de Gag et de CA, nous avons observé que les bandes correspondant à Gag et à CA étaient de la même intensité et à la même position pour les trois chimères et le virus sauvage. La diminution d'infectivité des chimères n'est donc pas due à une maturation anormale de Gag. Nous avons aussi effectué des RT-PCR à partir de l'ARN des virions produits par des cellules NIH 3T3 après plusieurs cycles de réplication. Cela nous a permis de vérifier que l'insertion de la région de *frameshift* était présente dans les chimères et n'avait pas été mutée. Nos résultats suggèrent donc que la diminution d'infectivité n'est pas due à des mutations dans cette région qui affecteraient l'efficacité de *frameshift* de façon indésirée. Notre hypothèse est que cette diminution dans l'infectivité des chimères par rapport au rétrovirus murin sauvage est causée par une différence entre l'efficacité de *frameshift* correspondant à chaque chimère et

l'efficacité de *readthrough* du MuLV sauvage qui changerait le rapport Gag-Pol/Gag. Nous avons donc évalué le rapport Gag-Pol/Gag des trois chimères et du virus sauvage afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle la différence dans l'efficacité du recoding affecte ce rapport dans les virions chimériques produits. Nous avons mentionné plus haut que, pour les essais d'infection, nous avons mesuré pour chaque suspension virale la quantité de Gag en effectuant un *dot blot* et la quantité de Gag-Pol en mesurant l'activité RT. L'anticorps anti-CA est capable de reconnaître la protéine de la capsid et le précurseur Gag et la transcriptase inverse, elle, est active à la fois lorsqu'elle est dans Gag-Pol et lorsqu'elle est libérée après le clivage du précurseur. Les deux essais utilisés permettent donc de détecter la quantité totale de Gag et de Gag-Pol incorporés dans les virions. Cela nous a permis de montrer que le rapport Gag-Pol/Gag est plus faible dans les virions chimériques que dans les virions sauvages. En attribuant arbitrairement une valeur de 100% au rapport Gag-Pol/Gag du virus sauvage, nous obtenons un rapport de 51%, 44% et 30% relativement pour les chimères longue, courte et B* respectivement. Ces résultats confirment que la diminution de l'efficacité du *frameshift* affecte le rapport Gag-Pol/Gag des virions chimériques produits. Par contre, nous ne savons pas si le rapport est le même pour tous les virions produit par une des chimères ou s'il y a un spectre de valeur des rapports, le rapport que nous obtenons correspondant à la moyenne. Il serait difficile d'imaginer que le virus contrôle la quantité de Gag-Pol de façon à assembler des virions contenant tous le même rapport Gag-Pol/Gag dérégulé. Nous privilégions donc la deuxième hypothèse qui suggère que les virions produits par les cellules infectées possèdent des rapports Gag-Pol/Gag différents, certains possédant un rapport identique à celui du virus sauvage et d'autres, un rapport diminué légèrement ou drastiquement. Cela suggère que certains virus se répliquent aussi bien que les virus sauvages alors que d'autres ont des difficultés à se répliquer en raison de l'écart de leur rapport Gag-Pol/Gag avec celui du virus sauvage.

5.4 Évaluation des efficacités du *frameshift* du VIH-1 et du *readthrough* du MuLV

Nos résultats ont démontré que le rapport Gag-Pol/Gag diffère entre les chimères et le virus sauvage, ce qui suggère une différence dans l'efficacité du *recoding* lorsque le *readthrough* de MuLV est comparé au *frameshift* du VIH. D'après la littérature, l'efficacité de *frameshift* de la région complète du VIH-1 est similaire à celle du *readthrough* de MuLV alors que celle de la région classique du VIH-1 et celle du sous-type B* sont plus faibles (Baril et al. 2003; Orlova et al. 2003). Cependant, ces valeurs ont été mesurées dans des systèmes différents, ce qui peut biaiser la comparaison. Nous avons donc mesuré les valeurs d'efficacité de *recoding* dans un même système d'étude dans des cellules en culture, en utilisant la luciférase comme gène rapporteur. Pour nous assurer que la présence de la région de *readthrough* en aval de la région de *frameshift* n'affectait pas l'efficacité de *frameshift* dans les chimères, nous avons utilisé des constructions dans lesquelles la région de *frameshift* étudiée est suivie par la région de *readthrough* inactivée. Cela reproduit exactement le contexte dans lequel se trouvent les régions de *frameshift* dans le génome des chimères. Le principe de notre système est d'insérer la région de *frameshift* ou de *readthrough* d'intérêt au début de la séquence codante de la luciférase de façon à ce que l'enzyme soit produite uniquement lorsque les ribosomes font un *frameshift* ou un *readthrough* respectivement. Le rapport entre les activités luciférase obtenues avec ces constructions et celles obtenues par des constructions contrôle dans lesquelles la production de la luciférase ne dépend plus d'un *recoding* correspond à l'efficacité du *recoding* pour chaque région insérée. Nous avons obtenu des valeurs de 1,3% pour la région de *frameshift* de B*, 1,5% pour la région courte et de 2,9% pour la région complète et une valeur de 5,2% pour la région de *readthrough* de MuLV (tableau 5-1). Nos résultats montrent que pour les trois régions de *frameshift*, la valeur obtenue est inférieure à la valeur obtenue avec la

Tableau 5-1 : Efficacités absolues et relatives de *frameshift* du VIH-1 et de *readthrough* de MuLV. Les efficacités de *recoding* ont été mesurées tel qu'indiqué dans le chapitre II. Une valeur de 100% est arbitrairement établie pour l'efficacité de *readthrough* de MuLV.

	MuLV sauvage	VIH-1 long	VIH-1 court	VIH-1 B*
Efficacité de <i>recoding</i> absolue	5,2%	2,9%	1,5%	1,3%
Efficacité de <i>recoding</i> relative	100%	55%	29%	24%

région de *readthrough*. En effet, l'efficacité de la région complète de *frameshift* du VIH-1 est environ 55% de l'efficacité de *readthrough* de MuLV, celle de la région classique, 29% et celle de la région du sous-type B*, 24%. Aussi, nos résultats montrent que la présence de la région de *readthrough* inactivée de MuLV en aval des différentes régions de *frameshift* n'affecte pas l'efficacité du *frameshift*. En effet, les valeurs de *frameshift* mesurées avec les constructions contenant la région de *readthrough* inactivée en aval ne diffèrent pas des valeurs de *frameshift* mesurées avec les constructions ne contenant pas cette insertion.

Nos résultats suggèrent qu'une différence d'un facteur deux dans l'efficacité du *recoding* affecte l'infectivité de MuLV. Par contre, le système de cellules en culture que nous utilisons pour mesurer les efficacités de *frameshift* et de *readthrough* ne tient pas compte du contrôle de l'efficacité du *readthrough* de MuLV par la transcriptase inverse virale observé par Orlova et al (Orlova et al. 2003). Selon ces chercheurs, la transcriptase inverse virale augmente l'efficacité du *readthrough* en se liant directement à eRF1, un facteur de terminaison eucaryote. Cette liaison séquestre eRF1 et diminue l'efficacité de la terminaison ce qui augmente les probabilités de *readthrough*. Dans notre système, la transcriptase inverse virale n'est pas présente. L'efficacité de *readthrough* que nous observons est donc peut-être plus faible que l'efficacité de *readthrough* réelle pour le virus. La différence entre l'efficacité de *readthrough* de MuLV et l'efficacité de *frameshift* de la région longue est peut-être plus grande qu'un facteur deux dans les virus par rapport aux conditions expérimentales utilisant un gène rapporteur. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions co-transfecter le provirus sauvage de MuLV, contenant la transcriptase inverse virale, avec le vecteur produisant la luciférase grâce au *readthrough* de MuLV, de façon à ce que la transcriptase inverse soit produite et puisse exercer son effet sur la stimulation du *readthrough* dans nos conditions expérimentales. Les valeurs ainsi obtenues seraient plus représentatives de la réalité et permettraient une meilleure comparaison de l'efficacité du *readthrough* de MuLV avec les efficacités de *frameshift* du VIH-1.

5.5 Relation entre la diminution d'infectivité et la diminution du rapport Gag-Pol/Gag

Ces résultats nous suggèrent que la différence dans le rapport Gag-Pol/Gag est responsable de la diminution de l'infectivité des chimères par rapport au virus sauvage. Les variations dans l'efficacité du *recoding* affectent le rapport Gag-Pol/Gag, rapport critique pour la production de particules virales infectieuses comme expliqué dans l'introduction, ce qui diminue l'infectivité des chimères. Baril et al.(2003) ont d'ailleurs montré que les valeurs d'efficacité de *frameshift* de tous les sous-types du groupe M du VIH-1 se trouvent à l'intérieur d'une fenêtre étroite, à moins de 35% de la moyenne. Ce résultat indique que le maintien du rapport Gag-Pol/Gag doit être sévèrement contrôlé, pour se placer à l'intérieur de cette fenêtre et permettre une réplication efficace des virus. Le même contrôle sévère pour le rapport Gag-Pol/Gag doit exister pour MuLV.

La diminution de la quantité de Gag-Pol doit affecter une étape importante de la réplication virale puisque les chimères dont le rapport Gag-Pol/Gag est diminué sont moins infectieuses que le virus sauvage. En affectant l'efficacité du *recoding*, la quantité de Gag-Pol produit et, par conséquent, la quantité d'enzymes virales produites, sont diminuées. Comme la maturation de Gag dans les chimères n'est pas différente de celle du virus sauvage, cela suggère que la diminution de la quantité de protéase virale n'est pas la source du problème. Cependant, il se pourrait que la diminution de transcriptase inverse ou d'intégrase soit responsable du problème de réplication des chimères. Pour vérifier cela, on pourrait construire un virus chimérique produisant soit la transcriptase inverse, soit l'intégrase, en trans grâce à un système de vecteurs particuliers. Cela permettrait de jouer sur les quantités de transcriptase inverse et d'intégrase et d'évaluer l'infectivité de ces chimères dans chaque condition.

Les variations du rapport Gag-Pol/Gag peuvent aussi affecter d'autres étapes de la réplication virale. Les études sur le rôle de Gag-Pol dans l'infectivité virale ont surtout été faites chez le VIH-1, mais certains résultats obtenus s'appliquent probablement à MuLV. Des études ont montré que chez le VIH-1, une augmentation de la quantité de Gag-Pol affecte la dimérisation de l'ARN (Shehu-Xhilaga et al. 2001). Nous pouvons envisager qu'une diminution de Gag-Pol affecte également ce processus. Étant donné que cette dimérisation est importante pour l'assemblage des particules virales et est nécessaire pour la transcription inverse du génome viral, il se pourrait qu'une faible diminution de la quantité de Gag-Pol soit suffisante pour ralentir la réplication virale de nos trois chimères. Des chercheurs ont aussi montré l'importance de Gag-Pol lors du changement de conformation des dimères d'ARN chez MuLV, appelé « maturation » des dimères (Fu et al. 1994). L'ARN est encapsidé sous forme de dimères immatures dans les virions et les enzymes virales, une fois libérées du précurseur Gag-Pol, contribuent à la « maturation » du dimère d'ARN. C'est la forme maturée de l'ARN qui est présente dans les virions infectieux. La diminution du rapport Gag-Pol/Gag pourrait affecter cette « maturation » du dimère d'ARN et ainsi ralentir la production de particules virales infectieuses. Enfin, des études ont montré que chez le VIH-1, Gag-Pol est impliqué dans l'encapsidation de l'ARN^{Lys} utilisé comme amorce durant la transcription inverse (Gabor et al. 2002; Kleiman et al. 2004). Cependant, pour MuLV, Gag-Pol ne semble pas impliqué dans ce processus (Fu et al. 1997) ce qui éliminerait cette hypothèse pour expliquer la diminution d'infectivité de nos chimères.

5.6 Conclusions et perspectives

Les chimères dérivées de MuLV dont la production de Gag-Pol dépend du *frameshift* du VIH-1 sont moins infectieuses que le virus sauvage qui utilise un *readthrough* programmé pour produire Gag-Pol. Ces résultats montrent que, pour MuLV, il est très important d'avoir un rapport Gag-Pol/Gag optimal pour la réplication. Une

diminution de Gag-Pol d'un facteur deux suffit à affecter l'infectivité du virus. Le maintien du rapport Gag-Pol/Gag est hautement régulé par le virus pour assurer sa réplication, ce qui confirme que le *recoding* est une cible intéressante pour le développement d'agents anti-rétroviraux. Des études ont montré qu'une augmentation du rapport Gag-Pol/Gag d'un facteur deux à trois inhibe la réplication du VIH-1 (Hung et al. 1998; Shehu-Xhilaga et al. 2001). Aussi, Biswas et al. (2004) ont récemment montré qu'une diminution de l'efficacité de frameshift d'un facteur quatre diminue l'infectivité du VIH-1 d'un facteur cent. Le ciblage du *frameshift* programmé -1 s'avère donc très intéressant pour le développement d'agents anti-VIH.

Le but de mon projet était de développer un virus chimérique dérivé du MuLV pouvant être utilisé pour tester des agents anti-VIH dirigés contre le *frameshift* -1 dans des souris. Cependant, les chimères obtenues sont au moins deux fois moins infectieuses que le virus sauvage. Il est certain que les risques de réversion *in vivo* sont plus grands lorsque la chimère est moins infectieuse que le virus sauvage (Granowitz et al. 1996). Cependant, il faudrait que les virus éliminent l'insertion d'une quarantaine de nucléotides contenant la région de *frameshift* du VIH-1 et réactivent le *readthrough* en mutant le codon glutamine pour un codon de terminaison. Ce scénario n'est pas impossible, mais il faut souligner qu'il n'y a pas de réversion dans les cellules en culture même après plusieurs cycles de réplication. Puisque le fait que l'efficacité du *frameshift* soit inférieure à celle du *readthrough* affecte l'infectivité des chimères, il serait intéressant de construire une chimère où l'efficacité de *frameshift* est accrue de façon à se rapprocher de la valeur de l'efficacité de *readthrough* du MuLV sauvage. Une telle chimère pourrait être fabriquée en remplaçant la séquence glissante de la chimère contenant la région complète de frameshift du VIH-1 (UUUUUUA) par sept uraciles UUUUUUU, en conservant le signal stimulateur intact. Cette mutation augmente l'efficacité de *frameshift* de la région longue du VIH-1 d'un facteur deux par rapport à la construction contenant la séquence glissante sauvage du VIH-1 (Brierley et al. 1992). Une telle chimère devrait avoir une infectivité comparable à celle du virus sauvage et pourrait être utilisée pour tester des agents dirigés contre le

frameshift du VIH-1, puisque seule la séquence glissante est mutée et non le signal stimulateur, qui est généralement la cible des agents ciblant le *frameshift* en développement.

Quoiqu'il en soit, même si les chimères sont moins infectieuses que le virus sauvage, la différence est suffisamment faible pour pouvoir envisager d'infecter des souris avec ces chimères, plus spécifiquement avec la chimère longue, qui contient la région complète de *frameshift* du VIH-1. S'il n'y a pas de réversion dans les souris, ce virus pourrait servir à tester l'effet d'agents ciblant le *frameshift*. Pour ce faire, il faudrait comparer l'évolution de la maladie causée par la chimère longue en absence et en présence de ces agents, suite à l'injection intra péritonéale de souriceaux nouveaux-nés n'ayant pas encore développés leur système immunitaire. Cependant, l'apparition de tumeurs caractéristiques de MuLV prend environ trois mois avec les virus sauvages (Tsichlis 1987). Comme les virus chimériques sont moins infectieux, l'apparition de tumeurs risque d'être plus longue. Cette technique lente et contraignante ne semble donc pas être la technique la plus appropriée pour évaluer l'effet d'agents ciblant le *frameshift* dans un mammifère. Il serait préférable de mesurer la virémie chez les souris infectées par le virus chimérique en présence et en absence de tels agents. Cependant, le système immunitaire de ces souris peut créer une pression sélective favorisant la réversion des virus chimériques en virus sauvages. Nous privilégions donc la technique suivante pour tester l'effet d'agents ciblant le *frameshift* en utilisant la chimère longue. En ajoutant un marqueur comme la *green fluorescent protein* (GFP) en 3' de la séquence codante de l'intégrase virale par exemple, nous serions en mesure de suivre la production virale dans les cellules des souris infectées sans attendre l'apparition de tumeurs. Étant plus rapide, cette méthode diminue les risques de réversion. De plus, les injections de virus peuvent se faire sur des souris *nudes* ou atteintes d'immunodéficience combinée sévère (SCID), des souris ne développant pas de système immunitaire mature, plutôt que sur des souriceaux. L'injection d'une telle chimère dans une souris permettrait de comparer la quantité de cellules infectées par le virus chimérique en absence et en présence d'agents ciblant le *frameshift*, en examinant par

exemple la situation des lymphocytes B ou des thymocytes infectés par le virus chimérique, par exemple. Il s'agit donc d'une méthode prometteuse utilisant un modèle de souris infectées par une chimère dérivée de MuLV pour évaluer l'effet d'agents anti-VIH ciblant le *frameshift*.

Bibliographie

- Alam, S.L., Wills, N.M., Ingram, J.A., Atkins, J.F. and Gesteland, R.F. 1999. Structural studies of the RNA pseudoknot required for readthrough of the gag-termination codon of murine leukemia virus. *J Mol Biol* **288**: 837-852.
- An, D.S., Morizono, K., Li, Q.X., Mao, S.H., Lu, S. and Chen, I.S. 1999. An inducible human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vector which effectively suppresses HIV-1 replication. *J. Virol.* **73**: 7671-7677.
- Baranov, P.V., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 2002. Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene* **286**: 187-201.
- Baranov, P.V., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 2004. P-site tRNA is a crucial initiator of ribosomal frameshifting. *Rna* **10**: 221-230.
- Baril, M., Dulude, D., Gendron, K., Lemay, G. and Brakier-Gingras, L. 2003. Efficiency of a programmed -1 ribosomal frameshift in the different subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 group M. *Rna* **9**: 1246-1253.
- Bartlett, J.A., DeMasi, R., Quinn, J., Moxham, C. and Rousseau, F. 2001. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-1 infected adults. *Aids* **15**: 1369-1377.
- Beier, H. and Grimm, M. 2001. Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Res* **29**: 4767-4782.
- Berkhout, B. 2004. RNA interference as an antiviral approach: targeting HIV-1. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **6**: 141-145.
- Berkowitz, R.D., Ohagen, A., Hoglund, S. and Goff, S.P. 1995. Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *J Virol* **69**: 6445-6456.
- Binley, J.M., Sanders, R.W., Master, A., Cayan, C.S., Wiley, C.L., Schiffner, L., Travis, B., Kuhmann, S., Burton, D.R., Hu, S.L., Olson, W.C. and Moore, J.P. 2002. Enhancing the proteolytic maturation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol* **76**: 2606-2616.

- Biswas, P., Jiang, X., Pacchia, A.L., Dougherty, J.P. and Peltz, S.W. 2004. The human immunodeficiency virus type 1 ribosomal frameshifting site is an invariant sequence determinant and an important target for antiviral therapy. *J Virol* **78**: 2082-2087.
- Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L. and Ramratnam, B. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J. Virol.* **77**: 11531-11535.
- Bour, S. and Strebel, K. 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* **5**: 1029-1039.
- Brakier-Gingras, L., Mélançon, P., Côté, M. Payant, C. Use of antisens oligomers for inhibition of HIV by decreasing ribosomal frameshifting. *Patent 1998, no 5707866*: approuvé le 28 mars 1997, émis le 13 janvier 1998.
- Brierley, I. 1995. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J. Gen. Virol.* **76**: 1885-1892.
- Brierley, I., Digard, P. and Inglis, S.C. 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**: 537-547.
- Brierley, I., Jenner, A.J. and Inglis, S.C. 1992. Mutational analysis of the "slippery-sequence" component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *J Mol Biol* **227**: 463-479.
- Brierley, I. and Pennell, S. 2001. Structure and function of the stimulatory RNAs involved in programmed eukaryotic-1 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**: 233-248.
- Brown, C.M., Dalphin, M.E., Stockwell, P.A. and Tate, W.P. 1993. The translational termination signal database. *Nucleic Acids Res* **21**: 3119-3123.
- Brunelle, M.N., Brakier-Gingras, L. and Lemay, G. 2003a. Replacement of murine leukemia virus readthrough mechanism by human immunodeficiency virus frameshift allows synthesis of viral proteins and virus replication. *J. Virol.* **77**: 3345-3350.

- Brunelle, M.N., Brakier-Gingras, L. and Lemay, G. 2003b. Replacement of murine leukemia virus readthrough mechanism by human immunodeficiency virus frameshift allows synthesis of viral proteins and virus replication. *J Virol* **77**: 3345-3350.
- Brunelle, M.N., Payant, C., Lemay, G. and Brakier-Gingras, L. 1999. Expression of the human immunodeficiency virus frameshift signal in a bacterial cell-free system: influence of an interaction between the ribosome and a stem-loop structure downstream from the slippery site. *Nucleic Acids Res* **27**: 4783-4791.
- Buchschacher, G.L., Jr., Yu, L., Murai, F., Friedmann, T. and Miyanohara, A. 1999. Association of murine leukemia virus pol with virions, independent of Gag-Pol expression. *J Virol* **73**: 9632-9637.
- Buckingham, R.H. 1994. Codon context and protein synthesis: enhancements of the genetic code. *Biochimie* **76**: 351-354.
- Burudi, E.M. and Fox, H.S. 2001. Simian immunodeficiency virus model of HIV-induced central nervous system dysfunction. *Adv Virus Res* **56**: 435-468.
- Cassan, M. and Rousset, J.P. 2001. UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Mol Biol* **2**: 3.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. and Kim, P.S. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**: 263-273.
- Chantry, D. 2004. HIV entry and fusion inhibitors. *Expert. Opin. Emerg. Drugs* **9**: 1-7.
- Chen, B.K., Rousso, I., Shim, S. and Kim, P.S. 2001. Efficient assembly of an HIV-1/MLV Gag-chimeric virus in murine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15239-15244.
- Chen, C. and Montelaro, R.C. 2003. Characterization of RNA elements that regulate gag-pol ribosomal frameshifting in equine infectious anemia virus. *J. Virol.* **77**: 10280-10287.
- Chen, X., Chamorro, M., Lee, S.I., Shen, L.X., Hines, J.V., Tinoco, I., Jr. and Varmus, H.E. 1995. Structural and functional studies of retroviral RNA pseudoknots involved in

- ribosomal frameshifting: nucleotides at the junction of the two stems are important for efficient ribosomal frameshifting. *Embo J* **14**: 842-852.
- Clapham, P.R. and McKnight, A. 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J. Gen. Virol.* **83**: 1809-1829.
- Coakley, E.P., Gillis, J.M. and Hammer, S.M. 2000. Phenotypic and genotypic resistance patterns of HIV-1 isolates derived from individuals treated with didanosine and stavudine. *AIDS* **14**: F9-15.
- Cohen, J. 2001. Building a small-animal model for AIDS, block by block. *Science* **293**: 1034-1036.
- Dayam, R. and Neamati, N. 2003. Small-molecule HIV-1 integrase inhibitors: the 2001-2002 update. *Curr Pharm Des* **9**: 1789-1802.
- Desrosiers, R.C. 1990. The simian immunodeficiency viruses. *Annu Rev Immunol* **8**: 557-578.
- Dinman, J.D., Richter, S., Plant, E.P., Taylor, R.C., Hammell, A.B. and Rana, T.M. 2002. The frameshift signal of HIV-1 involves a potential intramolecular triplex RNA structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5331-5336.
- Dinman, J.D. and Wickner, R.B. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol* **66**: 3669-3676.
- Dragic, T., Trkola, A., Thompson, D.A., Cormier, E.G., Kajumo, F.A., Maxwell, E., Lin, S.W., Ying, W., Smith, S.O., Sakmar, T.P. and Moore, J.P. 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5639-5644.
- Dulude, D., Baril, M. and Brakier-Gingras, L. 2002. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* **30**: 5094-5102.

- Dyer, B.W., Ferrer, F.A., Klinedinst, D.K. and Rodriguez, R. 2000. A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal. Biochem.* **282**: 158-161.
- Este, J.A. 2003. Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr Med Chem* **10**: 1617-1632.
- Eustice, D.C., Feldman, P.A., Colberg-Poley, A.M., Buckery, R.M. and Neubauer, R.H. 1991. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. *Biotechniques* **11**: 739-740, 742-733.
- Evans, M.J., Bacharach, E. and Goff, S.P. 2004. RNA sequences in the Moloney murine leukemia virus genome bound by the Gag precursor protein in the yeast three-hybrid system. *J. Virol.* **78**: 7677-7684.
- Farabaugh, P.J. 1996. Programmed translational frameshifting. *Microbiol Rev* **60**: 103-134.
- Farabaugh, P.J. 1997. Programmed readthrough of translational termination codons. *Programmed alternative reading of the genetic code.*
- Felsenstein, K.M. and Goff, S.P. 1988. Expression of the gag-pol fusion protein of Moloney murine leukemia virus without gag protein does not induce virion formation or proteolytic processing. *J Virol* **62**: 2179-2182.
- Felsenstein, K.M. and Goff, S.P. 1992a. Mutational analysis of the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus: requirements for expression of the gag-pol fusion protein. *J Virol* **66**: 6601-6608.
- Felsenstein, K.M. and Goff, S.P. 1992b. Mutational analysis of the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus: requirements for expression of the gag-pol fusion protein. *J. Virol.* **66**: 6601-6608.
- Feng, Y.X., Campbell, S., Harvin, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Rein, A. 1999. The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J. Virol.* **73**: 4251-4256.

- Feng, Y.X., Yuan, H., Rein, A. and Levin, J.G. 1992. Bipartite signal for read-through suppression in murine leukemia virus mRNA: an eight-nucleotide purine-rich sequence immediately downstream of the gag termination codon followed by an RNA pseudoknot. *J. Virol.* **66**: 5127-5132.
- Frankel, A.D. and Young, J.A. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**: 1-25.
- Fu, W., Gorelick, R.J. and Rein, A. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J Virol* **68**: 5013-5018.
- Fu, W., Ortiz-Conde, B.A., Gorelick, R.J., Hughes, S.H. and Rein, A. 1997a. Placement of tRNA primer on the primer-binding site requires pol gene expression in avian but not murine retroviruses. *J. Virol.* **71**: 6940-6946.
- Fu, W., Ortiz-Conde, B.A., Gorelick, R.J., Hughes, S.H. and Rein, A. 1997b. Placement of tRNA primer on the primer-binding site requires pol gene expression in avian but not murine retroviruses. *J Virol* **71**: 6940-6946.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Taube, R., Zhang, F., Geyer, M. and Peterlin, B.M. 2002. A minimal chimera of human cyclin T1 and tat binds TAR and activates human immunodeficiency virus transcription in murine cells. *J Virol* **76**: 12934-12939.
- Gabor, J., Cen, S., Javanbakht, H., Niu, M. and Kleiman, L. 2002. Effect of altering the tRNA(Lys)(3) concentration in human immunodeficiency virus type 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. *J Virol* **76**: 9096-9102.
- Garber, M.E. and Jones, K.A. 1999. HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Curr Opin Immunol* **11**: 460-465.
- Gardner, M.B. 1978. Type C viruses of wild mice: characterization and natural history of amphotropic, ecotropic, and xenotropic MuLv. *Curr Top Microbiol Immunol* **79**: 215-259.

- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G. and Sundquist, W.I. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**: 55-65.
- Goff, S.P. 1984. The genetics of murine leukemia viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **112**: 45-71.
- Goff, S.P. 2004. Genetic reprogramming by retroviruses: enhanced suppression of translational termination. *Cell Cycle* **3**: 123-125.
- Goila-Gaur, R., Demirov, D.G., Orenstein, J.M., Ono, A. and Freed, E.O. 2003. Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* **77**: 6507-6519.
- Granowitz, C., Berkowitz, R.D. and Goff, S.P. 1996. Mutations affecting the cytoplasmic domain of the Moloney murine leukemia virus envelope protein: rapid reversion during replication. *Virus Res* **41**: 25-42.
- Greene, W.C. 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **324**: 308-317.
- Greenway, A.L., Holloway, G., McPhee, D.A., Ellis, P., Cornall, A. and Lidman, M. 2003. HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *J Biosci* **28**: 323-335.
- Grentzmann, G., Ingram, J.A., Kelly, P.J., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 1998. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* **4**: 479-486.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M. and Sharp, P.M. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**: 607-614.
- Hanna, Z., Kay, D.G., Cool, M., Jothy, S., Rebai, N. and Jolicoeur, P. 1998. Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J Virol* **72**: 121-132.
- Harger, J.W., Meskauskas, A. and Dinman, J.D. 2002. An "integrated model" of programmed ribosomal frameshifting. *Trends Biochem Sci* **27**: 448-454.

- Harrell, L., Melcher, U. and Atkins, J.F. 2002. Predominance of six different hexanucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons. *Nucleic Acids Res* **30**: 2011-2017.
- Hatfield, D.L., Smith, D.W., Lee, B.J., Worland, P.J. and Oroszlan, S. 1990. Structure and function of suppressor tRNAs in higher eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**: 71-96.
- Hazuda, D.J., Young, S.D., Guare, J.P., Anthony, N.J., Gomez, R.P., Wai, J.S., Vacca, J.P., Handt, L., Motzel, S.L., Klein, H.J., Dornadula, G., Danovich, R.M., Witmer, M.V., Wilson, K.A., Tussey, L., Schleif, W.A., Gabryelski, L.S., Jin, L., Miller, M.D., Casimiro, D.R., Emini, E.A. and Shiver, J.W. 2004. Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science* **305**: 528-532.
- Hellen, C.U. and Sarnow, P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**: 1593-1612.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Huang, L., Zhang, L. and Chen, C.H. 2003. Potential drug targets on the HIV-1 envelope glycoproteins, gp120 and gp41. *Curr Pharm Des* **9**: 1453-1462.
- Hung, M., Patel, P., Davis, S. and Green, S.R. 1998. Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. *J Virol* **72**: 4819-4824.
- Isel, C., Ehresmann, C., Walter, P., Ehresmann, B. and Marquet, R. 2001. The emergence of different resistance mechanisms toward nucleoside inhibitors is explained by the properties of the wild type HIV-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **276**: 48725-48732.
- Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. and Varmus, H.E. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**: 280-283.

- Jamieson, B.D. and Zack, J.A. 1999. Murine models for HIV disease. *Aids* **13 Suppl A**: S5-11.
- Johnson, A.A., Marchand, C. and Pommier, Y. 2004. HIV-1 integrase inhibitors: a decade of research and two drugs in clinical trial. *Curr Top Med Chem* **4**: 1059-1077.
- Jolicoeur, P., Laperriere, A. and Beaulieu, N. 1992. Efficient production of human immunodeficiency virus proteins in transgenic mice. *J Virol* **66**: 3904-3908.
- Jones, D.S., Nemoto, F., Kuchino, Y., Masuda, M., Yoshikura, H. and Nishimura, S. 1989. The effect of specific mutations at and around the gag-pol gene junction of Moloney murine leukaemia virus. *Nucleic Acids Res* **17**: 5933-5945.
- Kang, H. 1998. Direct structural evidence for formation of a stem-loop structure involved in ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1. *Biochim Biophys Acta* **1397**: 73-78.
- Kao, S., Khan, M.A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A. and Strebel, K. 2003. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* **77**: 11398-11407.
- Kapp, L.D. and Lorsch, J.R. 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* **73**: 657-704.
- Karacostas, V., Wolffe, E.J., Nagashima, K., Gonda, M.A. and Moss, B. 1993. Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* **193**: 661-671.
- Kleiman, L., Halwani, R. and Javanbakht, H. 2004. The selective packaging and annealing of primer tRNA^{Lys3} in HIV-1. *Curr HIV Res* **2**: 163-175.
- Kohli, J. and Grosjean, H. 1981. Usage of the three termination codons: compilation and analysis of the known eukaryotic and prokaryotic translation termination sequences. *Mol Gen Genet* **182**: 430-439.

- Kollmus, H., Hentze, M.W. and Hauser, H. 1996. Regulated ribosomal frameshifting by an RNA-protein interaction. *Rna* **2**: 316-323.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E.A. and Gottlinger, H.G. 1995. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* **69**: 2759-2764.
- Kontos, H., Naphine, S. and Brierley, I. 2001. Ribosomal pausing at a frameshifter RNA pseudoknot is sensitive to reading phase but shows little correlation with frameshift efficiency. *Mol Cell Biol* **21**: 8657-8670.
- Kurland, C.G. 1978. The role of guanine nucleotides in protein biosynthesis. *Biophys J* **22**: 373-392.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Majeed, S., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. and Hendrickson, W.A. 2000. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure Fold Des* **8**: 1329-1339.
- LaBonte, J., Lebbos, J. and Kirkpatrick, P. 2003. Enfuvirtide. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**: 345-346.
- Lee, N.S. and Rossi, J.J. 2004. Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res.* **102**: 53-58.
- Léger, M., Sidani, S. and Brakier-Gingras, L. 2004. A reassessment of the response of the bacterial ribosome to the frameshift stimulatory signal of the human immunodeficiency virus type 1. *Rna* **10**: 1225-1235.
- Los Alamos National Laboratory. 2002. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences: Los Alamos National Laboratory.
- Marchand, C., Zhang, X., Pais, G.C., Cowansage, K., Neamati, N., Burke, T.R., Jr. and Pommier, Y. 2002. Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by beta-diketo acids. *J Biol Chem* **277**: 12596-12603.
- Marczinke, B., Fisher, R., Vidakovic, M., Bloys, A.J. and Brierley, I. 1998. Secondary structure and mutational analysis of the ribosomal frameshift signal of rous sarcoma virus. *J Mol Biol* **284**: 205-225.

- Mariani, R., Rasala, B.A., Rutter, G., Wiegers, K., Brandt, S.M., Krausslich, H.G. and Landau, N.R. 2001. Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* **75**: 3141-3151.
- Mariani, R., Rutter, G., Harris, M.E., Hope, T.J., Krausslich, H.G. and Landau, N.R. 2000. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J Virol* **74**: 3859-3870.
- Mathe, G. 1997. Hypothetical reasons of the HIV1-AIDS "tritherapy" failure. A challenging model. *Biomed Pharmacother* **51**: 413-416.
- Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R. and Bolognesi, D. 2004. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**: 215-225.
- Max, B. and Sherer, R. 2000. Management of the adverse effects of antiretroviral therapy and medication adherence. *Clin Infect Dis* **30 Suppl 2**: S96-116.
- McCaughan, K.K., Brown, C.M., Dalphin, M.E., Berry, M.J. and Tate, W.P. 1995. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5431-5435.
- McCune, J.M. 1997. Animal models of HIV-1 disease. *Science* **278**: 2141-2142.
- Meskauskas, A., Harger, J.W., Jacobs, K.L. and Dinman, J.D. 2003. Decreased peptidyltransferase activity correlates with increased programmed -1 ribosomal frameshifting and viral maintenance defects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* **9**: 982-992.
- Miller, M.D. and Hazuda, D.J. 2004. HIV resistance to the fusion inhibitor enfuvirtide: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist. Updat.* **7**: 89-95.
- Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M. and Wilson, D.B. 1988. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* **335**: 256-259.
- Mosier, D.E., Picchio, G.R., Gulizia, R.J., Sabbe, R., Poignard, P., Picard, L., Offord, R.E., Thompson, D.A. and Wilken, J. 1999. Highly potent RANTES analogues either

- prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J Virol* **73**: 3544-3550.
- Mottagui-Tabar, S., Tuite, M.F. and Isaksson, L.A. 1998. The influence of 5' codon context on translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **257**: 249-254.
- Nack, U. and Schnierle, B.S. 2003. Replacement of the murine leukemia virus (MLV) envelope gene with a truncated HIV envelope gene in MLV generates a virus with impaired replication capacity. *Virology* **315**: 209-216.
- Nair, V. 2002. HIV integrase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol* **12**: 179-193.
- Nair, V. 2003. Novel inhibitors of HIV integrase: the discovery of potential anti-HIV therapeutic agents. *Curr Pharm Des* **9**: 2553-2565.
- Namy, O., Hatin, I. and Rousset, J.P. 2001. Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Rep* **2**: 787-793.
- O'Connor, M. and Dahlberg, A.E. 1995. The involvement of two distinct regions of 23 S ribosomal RNA in tRNA selection. *J Mol Biol* **254**: 838-847.
- Oregon State University. 2004. Biology Program : Genome of the HIV-1 virion.
- Orlova, M., Yueh, A., Leung, J. and Goff, S.P. 2003. Reverse transcriptase of Moloney murine leukemia virus binds to eukaryotic release factor 1 to modulate suppression of translational termination. *Cell* **115**: 319-331.
- Park, J. and Morrow, C.D. 1992. The nonmyristylated Pr160gag-pol polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 interacts with Pr55gag and is incorporated into viruslike particles. *J. Virol.* **66**: 6304-6313.
- Parker, J. 1989. Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol Rev* **53**: 273-298.
- Parkin, N.T., Chamorro, M. and Varmus, H.E. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* **66**: 5147-5151.

- Philipson, L., Andersson, P., Olshevsky, U., Weinberg, R., Baltimore, D. and Gesteland, R. 1978. Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: enhancement of the gag-pol polypeptide with yeast suppressor tRNA. *Cell* **13**: 189-199.
- Platt, T. 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **55**: 339-372.
- Poulin, F.a.S., N. 2003. Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. *Translation mechanisms*. Georgetown, Tex.
New York: Landes Bioscience/Eurekah.com ;
Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp 280-297.
- Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E.A., King, N.M. and Schiffer, C.A. 2003. Viability of a drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease variant: structural insights for better antiviral therapy. *J. Virol.* **77**: 1306-1315.
- Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**: 557-572.
- Reed, M., Mariani, R., Sheppard, L., Pekrun, K., Landau, N.R. and Soong, N.W. 2002. Chimeric human immunodeficiency virus type 1 containing murine leukemia virus matrix assembles in murine cells. *J Virol* **76**: 436-443.
- Reid, W., Sadowska, M., Denaro, F., Rao, S., Foulke, J., Jr., Hayes, N., Jones, O., Doodnauth, D., Davis, H., Sill, A., O'Driscoll, P., Huso, D., Fouts, T., Lewis, G., Hill, M., Kamin-Lewis, R., Wei, C., Ray, P., Gallo, R.C., Reitz, M. and Bryant, J. 2001. An HIV-1 transgenic rat that develops HIV-related pathology and immunologic dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9271-9276.
- Reil, H. and Hauser, H. 1990. Test system for determination of HIV-1 frameshifting efficiency in animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1050**: 288-292.
- Rodnina, M.V. and Wintermeyer, W. 2001. Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu Rev Biochem* **70**: 415-435.

- Root, M.J. and Hamer, D.H. 2003. Targeting therapeutics to an exposed and conserved binding element of the HIV-1 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5016-5021.
- Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S.M. and Mak, J. 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* **75**: 1834-1841.
- Shehu-Xhilaga, M., Hill, M., Marshall, J.A., Kappes, J., Crowe, S.M. and Mak, J. 2002. The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *J. Virol.* **76**: 4331-4340.
- Shen, L.X. and Tinoco, I., Jr. 1995. The structure of an RNA pseudoknot that causes efficient frameshifting in mouse mammary tumor virus. *J Mol Biol* **247**: 963-978.
- Shigemoto, K., Brennan, J., Walls, E., Watson, C.J., Stott, D., Rigby, P.W. and Reith, A.D. 2001. Identification and characterisation of a developmentally regulated mammalian gene that utilises -1 programmed ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res* **29**: 4079-4088.
- Shinnick, T.M., Lerner, R.A. and Sutcliffe, J.G. 1981. Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* **293**: 543-548.
- Smith, A.J., Cho, M.I., Hammarskjold, M.L. and Rekosh, D. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 Pr55gag and Pr160gag-pol expressed from a simian virus 40 late replacement vector are efficiently processed and assembled into viruslike particles. *J Virol* **64**: 2743-2750.
- Somogyi, P., Jenner, A.J., Brierley, I. and Inglis, S.C. 1993. Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. *Mol Cell Biol* **13**: 6931-6940.
- Sopper, S., Koutsilieri, E., Scheller, C., Czub, S., Riederer, P. and ter Meulen, V. 2002. Macaque animal model for HIV-induced neurological disease. *J Neural Transm* **109**: 747-766.
- Stevenson, M. 2002. Molecular biology of lentivirus-mediated gene transfer. *Curr Top Microbiol Immunol* **261**: 1-30.

- Tang, H., Kuhen, K.L. and Wong-Staal, F. 1999. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* **33**: 133-170.
- Tate, W.P., Poole, E.S. and Mannering, S.A. 1996. Hidden infidelities of the translational stop signal. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **52**: 293-335.
- Telenti, A., Martinez, R., Munoz, M., Bleiber, G., Greub, G., Sanglard, D. and Peters, S. 2002. Analysis of natural variants of the human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshift stem-loop structure. *J. Virol.* **76**: 7868-7873.
- ten Dam, E.B., Pleij, C.W. and Bosch, L. 1990. RNA pseudoknots: translational frameshifting and readthrough on viral RNAs. *Virus Genes* **4**: 121-136.
- Trkola, A., Kuhmann, S.E., Strizki, J.M., Maxwell, E., Ketas, T., Morgan, T., Pugach, P., Xu, S., Wojcik, L., Tagat, J., Palani, A., Shapiro, S., Clader, J.W., McCombie, S., Reyes, G.R., Baroudy, B.M. and Moore, J.P. 2002. HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 395-400.
- Tsichlis, P.N. 1987. Oncogenesis by Moloney murine leukemia virus. *Anticancer Res* **7**: 171-180.
- Tu, C., Tzeng, T.H. and Bruenn, J.A. 1992. Ribosomal movement impeded at a pseudoknot required for frameshifting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8636-8640.
- Tumer, N.E., Parikh, B.A., Li, P. and Dinman, J.D. 1998. The pokeweed antiviral protein specifically inhibits Ty1-directed +1 ribosomal frameshifting and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* **72**: 1036-1042.
- UNAIDS. 2004. UNAIDS: The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS.
- Velazquez-Campoy, A., Todd, M.J., Vega, S. and Freire, E. 2001. Catalytic efficiency and vitality of HIV-1 proteases from African viral subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6062-6067.
- Wang, M.Q. and Goff, S.P. 2003. Defects in virion production caused by mutations affecting the C-terminal portion of the Moloney murine leukemia virus capsid protein. *J. Virol.* **77**: 3339-3344.

- Wills, N.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 1991a. Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**: 6991-6995.
- Wills, N.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 1991b. Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6991-6995.
- Wills, N.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 1994a. Pseudoknot-dependent read-through of retroviral gag termination codons: importance of sequences in the spacer and loop 2. *Embo J* **13**: 4137-4144.
- Wills, N.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. 1994b. Pseudoknot-dependent read-through of retroviral gag termination codons: importance of sequences in the spacer and loop 2. *Embo J.* **13**: 4137-4144.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. 1985. Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**: 1618-1622.
- Yuan, B., Campbell, S., Bacharach, E., Rein, A. and Goff, S.P. 2000. Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J. Virol.* **74**: 7250-7260.
- Zaitseva, M., Peden, K. and Golding, H. 2003. HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1614**: 51-61.
- Zander, K., Sherman, M.P., Tessmer, U., Bruns, K., Wray, V., Prechtel, A.T., Schubert, E., Henklein, P., Luban, J., Neidleman, J., Greene, W.C. and Schubert, U. 2003. Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *J Biol Chem* **278**: 43202-43213.
- Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C. and Lingappa, J.R. 2002. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* **415**: 88-92.